

Aus der Klinik für Augenheilkunde  
der Medizinischen Fakultät Charité  
der Humboldt-Universität zu Berlin

**DISSERTATION**

**Untersuchungen zur Nachstarprävention in vitro**  
**mittels des zyklischen RGD-Peptids cRGD<sub>15</sub>FV**

Zur Erlangung des akademischen Grades  
Doctor medicinae (Dr. med.)

**Vorgelegt der Medizinischen Fakultät Charité  
der Humboldt-Universität zu Berlin**

**von**

**Frau Corina Kojetinsky  
aus Berlin**

Dekan: Prof. Dr. Joachim W. Dudenhausen

Gutachter:                   1. PD Dr. Dr. P. Rieck  
                                  2. Prof. Dr. K. Engelmann  
                                  3. Prof. Dr. D. T. Pham

Datum der Einreichung:   14.09.2001

Datum der Promotion:     24.05.2002

## **Abstract**

**Hintergrund:** RGD-Peptide hemmen kompetitiv die Adhäsionsmoleküle von Linsenepithelzellen (LEC). Ziel unserer Untersuchungen war es herauszufinden, ob diese Peptide in der Lage sind, auch nach Kurzzeitinkubation eine suffiziente Inhibition der Adhäsion bzw. eine Ablösung adhärenter Zellen und damit eine ausreichende Prävention des Nachstars zu bewirken. Außerdem wurde überprüft, ob das von uns verwendete RGD-Peptid eine Toxizität für die Hornhaut aufweist.

**Material und Methoden:** Kulturen boviner und humaner LEC, boviner Hornhautendothelzellen, humane und bovine Linsenkapselexzidate und humane explantierte Hornhäute wurden verwendet. Wir untersuchten die Inhibition der Adhäsion und die Ablösung konfluenter LEC-Layer mittels des zyklischen RGD-Peptids cRGD<sub>D</sub>FV (Inkubationszeiten von 1 Stunde bzw. 5-7 Tagen und Konzentrationen von  $10^{-4}$  M,  $10^{-3}$  M und  $2 \times 10^{-3}$  M wurden angewandt).

**Ergebnisse:** Wir fanden nach nur einstündiger Inkubation in der Kulturschale eine Adhäsionsinhibition von 48% für bovine LEC und von 100% für humane LEC. Die Differenz zwischen Kontrollpeptid und cRGD<sub>D</sub>FV war statistisch signifikant ( $p < 0,0001$ ). Eine vollständige Lösung der Zellen gelang von der Kulturschale nach 37 Minuten, von Linsenkapiteln jedoch nicht. Nachstarzellen ließen sich nach 3 Tagen Inkubation mit RGD-Peptid und durch zusätzliche Spülung vollständig vom Kapselsack lösen. Humane Hornhäute wiesen keinerlei Defekte im Endothel bzw. Epithel nach 48 Stunden Inkubation mit cRGD<sub>D</sub>FV  $2 \times 10^{-3}$  M auf.

**Schlußfolgerung:** Eine Kurzzeitinkubation der LEC mit cRGD<sub>D</sub>FV führte in vitro zu keiner ausreichenden Hemmung der Adhäsion der LEC. Die Lösung bereits adhärenter LEC mittels cRGD<sub>D</sub>FV gelang nicht. Somit scheint ein Einsatz des von uns verwendeten RGD-Peptids zur Prävention des Nachstars nicht erfolgversprechend. Ob eine Verwendung von cRGD<sub>D</sub>FV zur erleichterten Nachstarabsaugung sinnvoll ist, sollte in weiteren in-vivo Untersuchungen geprüft werden.

## **Summary**

**Purpose:** RGD-peptides competitively inhibit adhesion molecules of the lens epithelial cells (LEC). The purpose of our study was to investigate whether this peptide could be able to inhibit adhesion sufficiently after short term incubation resp. to detach adherent cells and so to prevent posterior capsule opacification (PCO). Also there was proofed if there is any toxicity for the cornea.

**Methods:** Cultures of bovine and human LEC, bovine cornea endothelial cells, human and bovine fragments of the lens capsule and explanted human corneas were used. The inhibition of adhesion and the detachment of confluent LEC-layer by the cyclic RGD-peptide cRGD<sub>D</sub>FV were studied (incubation time was 1 hour resp. 5-7 days and concentrations of  $10^{-4}$ ,  $10^{-3}$  M and  $2 \times 10^{-3}$  M were used).

**Results:** After one hour incubation time in a culture dish inhibition of adhesion was 48% for bovine LEC resp. 100% for human LEC. There was a statistically significant difference between the control-peptide-group and cRGD<sub>D</sub>FV ( $p < 0,0001$ ). Cell-detachment from lens capsules was not achieved, but complete detachment from the culture dish occurred after 37 minutes. Transformed LEC in a lens capsule with PCO could be detached completely after 3 days incubation with RGD-peptide and a flushing of the capsule. There were no defects in endothelium nor epithelium of human corneas after 48 hours incubation with  $2 \times 10^{-3}$  M cRGD<sub>D</sub>FV.

**Conclusions:** Short-term incubation of LEC by cRGD<sub>D</sub>FV did not lead to a sufficient inhibition of adhesion in vitro. A detachment of adherent LEC by cRGD<sub>D</sub>FV was not achieved. Therefore we believe there will be no success of the RGD-peptide used by us in prevention of PCO. To investigate if there is an effect in PCO therapy in-vivo studies are needed.

<b>1. EINLEITUNG</b>	<b>8</b>
1.1. DIE LINSE	8
1.1.1. ANATOMIE DER LINSE	8
1.1.2. ALTERSVERÄNDERUNGEN DER LINSE	10
1.2. DIE KATARAKT	10
1.3. DIE KATARAKTEXTRAKTION	12
1.4. POSTOPERATIVE KOMPLIKATIONEN DER KATARAKTOPERATION	12
1.4.1. DER NACHSTAR – DEFINITION, INZIDENZ, ENTSTEHUNG UND FORMEN	13
1.4.2. THERAPIE DES NACHSTARS	16
1.4.3. PRÄVENTION DES NACHSTARS	17
1.5. INTEGRINE UND IHRE BEDEUTUNG FÜR DIE ZELLADHÄSION	21
1.6. BISHERIGE UNTERSUCHUNGEN ZUR WIRKUNG VON RGD-PEPTIDEN	25
1.6.1. RGD-PEPTIDE	25
1.6.2. UNTERSUCHUNGEN ZUR NACHSTARPRÄVENTION MITTELS RGD-PEPTIDEN IM BEREICH DER OPHTHALMOLOGIE	27
1.6.3. RGD-PEPTIDE IN ANDEREN MEDIZINISCHEN BEREICHEN	30
<b>2. ZIEL DER EXPERIMENTELLEN ARBEIT</b>	<b>31</b>
<b>3. MATERIAL UND METHODEN</b>	<b>33</b>
3.1. ZELLKULTUR VON LINSENEPITHEL-UND HORNHAUTENDOTHELZELLEN	33
3.1.1. GEWINNUNG VON HORNHAUTENDOTHELZELLEN	33
3.1.2. GEWINNUNG VON LINSENEPITHELZELLEN	33
3.1.3. ZELLKULTUR	34
3.2. GEWINNUNG HUMANER LINSENEPITHELZELLEN UND HUMANER INTAKTER HORNHÄUTE	35
3.3. UNTERSUCHUNGEN ZUR ADHÄSIONSINHIBITION	37
3.3.1. UNTERSUCHUNG DER ADHÄSIONSINHIBITION AUF DEM BODEN DER KULTURSCHALE	37
3.3.2. UNTERSUCHUNG DER ADHÄSIONSINHIBITION AUF EXZIDIERTEN BOVINEN VORDERKAPSELN	39
3.4. UNTERSUCHUNG ZUR LÖSUNG ADHÄRENTER LINSENEPITHELZELLEN UND HORNHAUTENDOTHELZELLEN	41
3.4.1. LÖSUNG ADHÄRENTER BOVINER LEC VOM BODEN DER KULTURSCHALE	41
3.4.2. LÖSUNG ADHÄRENTER LEC VON EXZIDIERTEN BOVINEN VORDERKAPSELN	42

3.4.3.	LÖSUNG ADHÄRENTER HUMANER LEC VON HUMANEN VORDERKAPSELN	43
3.4.4.	SPENDER-INTRAOKULARLINSE IM KAPSELSACK	44
3.4.5.	EINFLUß VON cRGDdFV AUF KONFLUENTE HORNHAUTENDOTHELZELL-LAYER	44
3.4.6.	EINFLUß VON cRGDdFV AUF HUMANE HORNHÄUTE IN VITRO	45
<b>3.5.</b>	<b>STATISTISCHE AUSWERTUNG</b>	<b>45</b>
3.5.1.	UNTERSUCHUNGEN DER ADHÄSIONSINHIBITION BOVINER UND HUMANER LEC AUF DEM BODEN DER KULTURSCHALE	45
3.5.2.	LÖSUNG ADHÄRENTER HUMANER LEC VON HUMANEN VORDERKAPSELN	46
<b>4.</b>	<b>ERGEBNISSE</b>	<b>47</b>
4.1.	UNTERSUCHUNGEN ZUM ADHÄSIONSVERHALTEN <i>BOVINER</i> LINSENEPITHELZELLEN UNTER cRGDdFV AUF DEM BODEN DER KULTURSCHALE	47
4.2.	UNTERSUCHUNGEN ZUM ADHÄSIONSVERHALTEN <i>HUMANER</i> LINSENEPITHELZELLEN UNTER cRGDdFV AUF DEM BODEN DER KULTURSCHALE	51
4.3.	UNTERSUCHUNGEN ZUM ADHÄSIONSVERHALTEN <i>HUMANER UND BOVINER</i> LINSENEPITHELZELLEN UNTER cRGDdFV AUF EXZIDIERTEN BOVINEN VORDERKAPSELN	54
4.4.	UNTERSUCHUNGEN ZUM ABLÖSUNGSVERHALTEN KONFLUENTER LINSENEPITHELZELLEN	56
4.4.1.	ABLÖSUNG BOVINER LEC VOM BODEN DER KULTURSCHALE	56
4.4.2.	ABLÖSUNG BOVINER LEC VON EXZIDIERTEN BOVINEN LINSENVORDERKAPSELN	57
4.4.3.	ABLÖSUNG HUMANER LEC VON HUMANEN LINSENVORDERKAPSELN	58
4.4.4.	ABLÖSUNG HUMANER LEC VON HUMANEN LINSENKAPSELN MIT IOL-IMPLANTAT	62
4.5.	UNTERSUCHUNGEN ZUM EINFLUß VON cRGDdFV AUF DAS HORNHAUTENDOTHEL	65
4.5.1.	HORNHAUTENDOTHELZELL-LAYER AUF DEM BODEN DER KULTURSCHALE	65
4.5.2.	HORNHAUTENDOTHEL UND –EPITHEL HUMANER HORNHÄUTE	66
<b>5.</b>	<b>DISKUSSION</b>	<b>68</b>
5.1.	DISKUSSION DER ERGEBNISSE	68
5.1.1.	DISKUSSION DER ERGEBNISSE ZU ADHÄSION UND PROLIFERATION DER LEC AUF DEM BODEN DER KULTURSCHALE	68
5.1.2.	UNTERSUCHUNGEN ZU ADHÄSION UND PROLIFERATION DER LEC AUF EXZIDIERTEN BOVINEN VORDERKAPSELN	73
5.1.3.	UNTERSUCHUNGEN ZUR ABLÖSUNG DER LEC	75
5.1.4.	UNTERSUCHUNGEN ZUR WIRKUNG VON cRGDdFV AUF DAS HORNHAUTENDOTHEL	77

<b>5.2.</b>	<b>FEHLERANALYSE</b>	<b>78</b>
5.2.1.	UNTERSUCHUNGEN ZUR ADHÄSION DER LEC AUF DEM BODEN DER KULTURSCHALE	78
5.2.2.	UNTERSUCHUNGEN ZUR ADHÄSION DER LEC AUF LINSENKAPSELN	78
5.2.3.	UNTERSUCHUNGEN ZUR ABLÖSUNG DER LEC	79
5.2.4.	UNTERSUCHUNGEN ZUR WIRKUNG VON CRGDdFV AUF DAS HORNHAUTENDOTHEL	79
<b>5.3.</b>	<b>SCHLUßFOLGERUNG</b>	<b>80</b>
<b>6.</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG</b>	<b>81</b>
<b>6.1.</b>	<b>PROBLEMSTELLUNG</b>	<b>81</b>
<b>6.2.</b>	<b>MECHANISMEN DER ENTSTEHUNG EINES NACHSTARS UND DEREN BEEINFLUSSUNG DURCH RGD-PEPTIDE</b>	<b>81</b>
<b>6.3.</b>	<b>ZIELSTELLUNG</b>	<b>82</b>
<b>6.4.</b>	<b>MATERIAL UND METHODEN</b>	<b>82</b>
<b>6.5.</b>	<b>ERGEBNISSE</b>	<b>83</b>
<b>6.6.</b>	<b>DISKUSSION</b>	<b>83</b>
<b>7.</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS</b>	<b>85</b>
<b>8.</b>	<b>LEBENS LAUF</b>	<b>92</b>
<b>9.</b>	<b>VERÖFFENTLICHUNGEN</b>	<b>93</b>
<b>10.</b>	<b>DANKSAGUNG</b>	<b>94</b>
<b>11.</b>	<b>ERKLÄRUNG AN EIDES STATT</b>	<b>95</b>

## 1. Einleitung

Die Funktionen der Linse bestehen in ihrer Brechkraft, in der Befähigung des Auges zur Akkomodation und in ihrer protektiven Filterwirkung für Makula und Netzhaut durch Absorption von UV-Strahlung zwischen 300 und 400 nm.

### 1.1. Die Linse

Die Kenntnis der Anatomie der Linse ermöglicht das Verständnis pathologischer Prozesse, wie sie bei einer Störung der Integrität der Linse durch Erkrankungen oder Ophthalmochirurgie auftreten – und somit auch das Verständnis des Nachstars.

#### 1.1.1. *Anatomie der Linse*

Die Linse des Erwachsenen ist ein bikonvexes Organ mit einem äquatorialen Durchmesser von 9-10 mm und einem axialen Durchmesser von 4-5 mm. Die Linse ist durch die Zonulafasern und das Wieger'sche Band hinter der Iris in der Fossa patellaris des Glaskörpers fixiert. Die Zonulafasern übertragen außerdem die Akkomodationsbewegung des Ziliarmuskels auf die Linsenkapsel. Sie inserieren in der sogenannten Zonulalamelle, im äquatorialen Bereich der Kapsel. Die Linse enthält weder Gefäße noch Nervenfasern. Ernährt wird sie durch Diffusion der Nährstoffe des Kammerwassers. Das Linsenepithel ist für den Ionentransfer und die Entfernung von Abbau-Produkten verantwortlich [1].

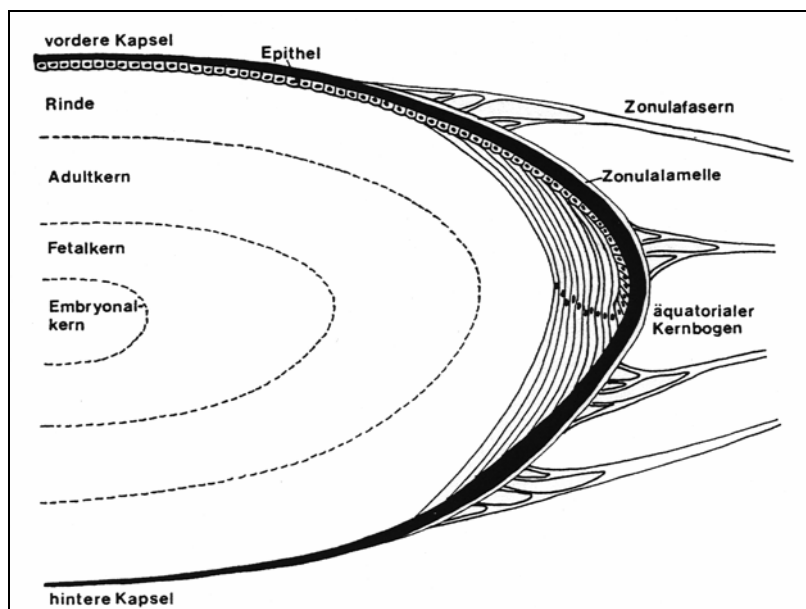
Von außen nach innen besteht die Linse aus drei Komponenten: Der Kapsel, dem Epithel und den Linsenfasern (s. Abb. 1.1.):

Die *Linsenkapsel* ist nicht nur Insertionsstruktur für die Zonulafasern, sondern auch Permeabilitätsbarriere. Sie besteht aus einer elastischen, PAS-positiven Basalmembran, die in ihrem vorderen und paraäquatoriellen Bereich die größte Dicke aufweist. Strukturkomponenten sind Kollagene, Laminin, Heparansulfat-Proteoglykane, Entactin und Fibronectin [1]. Kollagen I, III und IV sind gleichmäßig über die gesamte humane Linsenkapsel älterer Menschen verteilt, Laminin findet sich v.a. in den sogenannten linearen Densitäten, welche über die gesamte Dicke der Kapsel verteilt sind [2]. Diese linearen Densitäten sind geformte Elemente. Es lassen sich zwei verschiedene Formen unterscheiden: fibrilläre und granuläre. Letztere finden sich auch an der Oberfläche der Kapsel in Vertiefungen der inneren Epithelzellschicht [2]. In Untersu-



chungen an bovinen Linsenvorderkapseln [3] wurden als Hauptkomponenten der Linsenkapsel Kollagen IV und Entactin bestimmt, weniger groß war der Anteil von Laminin und Heparansulfat, und nur sehr lückenhaft und schwach gelang der Nachweis von Fibronectin.

Direkt unter der vorderen Kapsel liegt eine einschichtige Lage kubischer *Epithelzellen*. Die Zelldichte nimmt vom Zentrum zur Peripherie hin zu, auch ihre Form ändert sich: die Zellen werden schmaler, zylindrischer und länger. Sie werden zu Linsenfasern. Epithelzellen am zentralen vorderen Pol befinden sich im Ruhezustand, Zellen des Äquators hingegen zeigen eine hohe Stoffwechselaktivität und höchste Mitoseraten. Hier erfolgt die Differenzierung der Epithelzellen in Faserzellen. Unter der Hinterkapsel finden sich unter physiologischen Bedingungen keine Epithelzellen.



**Abb. 1.1.:** Mikroskopische Anatomie der **Linse** (nach Naumann [1])

Die eigentliche Substanz der Linse bilden die ca. 2.000 Faserzellen. Junge Fasern werden von den nachwachsenden zum Zentrum hin verdrängt. Die Linse wächst also appositionell, die entstehenden Schichten sind konzentrisch angeordnet. So ist der Linsenkern der älteste Bestandteil (Embryonalkern), nach außen folgen Fetal- und Adultkern sowie die Rinde. In der äquatorialen Rinde verlagern sich die Kerne der neugebildeten Faserzellen leicht nach vorn, so daß ein Kernbogen entsteht (Becker'scher Kernbogen). Ausdifferenzierte Linsenfasern bestehen aus 95 % Strukturproteinen ( $\alpha$ -,  $\beta$ - und  $\gamma$ -Kristalline) und 5 % Zytoskelettelementen, wie Aktin, Vimentin und Tubulin [1].

Letztere sind von entscheidender Bedeutung für die Akkomodation.

### **1.1.2. Altersveränderungen der Linse**

Die Proliferationsfähigkeit des Linsenepithels bleibt bis zum Tod des Menschen erhalten. Es kommt zu einem ständigen appositionellen Wachstum der Linsenfasern. Die Kompression der zentralen Fasern führt im höheren Lebensalter zu deren Degeneration, der Kernsklerose. Diese geht fließend in eine pathologische Kerntrübung über. Die Linse nimmt an Gewicht und Volumen zu (von 65 mg bei der Geburt auf ca. 270 mg und von ca. 3,5-4 mm axialem Durchmesser auf ca. 5 mm). Auch die Linsenkapsel verändert sich im Laufe des Lebens und verdickt sich vor allem im vorderen Anteil und im Äquatorbereich. Die Linsenfasern unterliegen Glykosilierungs- und Quervernetzungsprozessen, die dann zur Anhäufung von unlöslichen, hochmolekularen Proteinaggregaten führen – dies kann auch Trübungen und damit pathologische Veränderungen zur Folge haben [1].

### **1.2. Die Katarakt**

Die Katarakt ist eine Trübung der Linse. Dabei können abnorme proliferative von degenerativen Veränderungen unterschieden werden.

Bei abnorm proliferativen Veränderungen kommt es durch unterschiedliche Reize oder kongenital zur einer ausgeprägten Proliferation atypischer Linsenepithelzellen.

Ist die Linsenkapsel intakt, kann es zur Bildung einer *Cataracta subcapsularis anterior* durch Pseudometaplasie der eigentlich nicht proliferierenden anterioren Linsenepithelzellen (LEC) kommen. Durch Transformation in fibrozytenähnliche Zellen können diese eine fibröse Kollagen-Matrix bilden. Die Zellen enthalten Myofilamente und exprimieren  $\alpha$ -smooth-muscle-actin [4]. Dadurch ist eine Faltenbildung der Vorderkapsel möglich. Klinisch fällt eine umschriebene, scheibenförmige oder diffuse Trübung unter der vorderen Linsenkapsel auf.

Die *Cataracta subcapsularis anterior* kommt z.B. als kongenitale Katarakt, nach Traumata oder Uveitiden und bei atopischer Dermatitis vor. Bei der kongenitalen Katarakt liegt eine gestörte Differenzierung der Linsenfasern vor, sie transformieren sich in fibrozytenähnliche Zellen.

Zur Bildung einer *Cataracta subcapsularis posterior* kommt es durch Migration von LEC

aus dem Äquatorbereich unter die hintere Kapsel. Auch bei dieser Katarakt findet wieder eine Transformation in fibrozytenähnliche Zellen statt. Diese produzieren allerdings keine extrazelluläre Matrix, sondern wandeln sich am hinteren Pol in sogenannte Wedl-Blasenzellen um: große ballonförmige Zellen mit einem kleinen Zellkern und einem vakuolenreichen, organellenarmen Zytoplasma. Sie werden als dysplastische, abortive Faserzellen interpretiert. Bei überstürzter Kernteilung können auch mehrkernige Riesenzellen entstehen. Blasen- und Riesenzellen degenerieren samt umgebender Rindenzellen, so daß ein Nekroseareal entsteht, das von proliferierenden Blasen- und Epithelzellen umgeben wird. Klinisch imponieren dann vakuolige, tuffsteinartige Trübungen bis zu plaqueförmigen Trübungen der hinteren Rinde.

Ursache einer *Cataracta subcapsularis posterior* können intraokulare Erkrankungen wie die Retinopathia pigmentosa, hohe Myopie u.a. sein, ebenso wie systemische Erkrankungen (z.B. die myotone Dystrophie), aber auch elektromagnetische Strahlung und Medikamente (z.B. Kortikosteroide). Sie ist die häufigste Kataraktform des mittleren Lebensalters. Ihr Anteil an der senilen Katarakt beträgt aber nur 5 %.

Bei kleinen Defekten der Vorderkapsel, ohne Kammerwassereintritt unter die Kapsel, können fokale Epithelproliferationen die Wunde wieder verschließen. Größere Kapseldefekte, die zum Beispiel im Rahmen einer Kataraktextraktion entstehen, führen zu einer *Cataracta secundaria* (s. 1.4.1.).

Für die **senile Katarakt** sind hingegen degenerative Veränderungen charakteristisch. Ursächlich werden Störungen des osmotischen Gleichgewichtes bei zunehmendem Alter angenommen. Der fließende Übergang von physiologischen Altersveränderungen des Linsenkerns zur Kernsklerose ist bereits beschrieben worden (s. 1.1.2.).

Hierbei werden nekrotische Veränderungen des zentralen Epithels, eine verstärkte intrazytoplasmatische Einlagerung von Glykogengranula und eine lipide Degeneration der Epithelzellen und oberflächlichen Linsenfasern beobachtet. Die Linsenfasern degenerieren hydropisch, so daß es zu Flüssigkeitsansammlungen in und zwischen den oberflächlichen Rindenzellen kommt, den sogenannten radiären Wasserspalten bzw. der lamellären Zerklüftung der Rinde. Auch bilden sich komplexe Konfigurationen der Fasermembranen, die punktförmige oder farbschillernde Trübungen hervorrufen. Bei übermäßiger Degeneration der gequollenen Linsenfasern zerfallen diese in globuläre Tröpfchen, die sogenannten Morgagni-Kugeln. Klinisch imponieren diese als speichen- oder kuneiforme Trübungen. Die senile Katarakt zeigt weiterhin zytoplasmatische und

kristalline Einlagerungen, hier vor allem Kalziumoxalat-Kristalle im Linsenkern. Auch Verkalkungen werden beobachtet.

Die Linsenrinde kann eine Kolliquationsnekrose erfahren. Dies ist bei der *Cataracta matura* der Fall, die sich durch eine verflüssigte milchigtrübe Rindensubstanz auszeichnet. Der sklerotische Linsenkern kann dann bei einer *Cataracta hypermatura Morgagni* innerhalb dieser verflüssigten Rinde nach unten sinken. Durch solche Kolliquationsnekrosen sind Spontanperforationen der Kapsel möglich [1].

### **1.3. Die Kataraktextraktion**

Die beschriebenen Trübungen der Linse können durch eine Kataraktextraktion entfernt werden. Jährlich werden in Deutschland ca. 400.000 Kataraktoperationen vorgenommen [5].

Die bevorzugte Methode der Kataraktextraktion ist die Phakoemulsifikation. Dabei werden Ultraschall-Wellen zur Verflüssigung des Linsenkerns benutzt.

Es ist eine Eröffnung der vorderen Linsenkapsel (vordere Kapsulorrhexis) erforderlich. Nach einer Politur der Kapsel zur Entfernung noch anhaftender Linsenepithelzellen wird in dieser die Intraokularlinse eingesetzt. So kann die klare Kunststofflinse gut intraokular positioniert und fixiert werden.

Ist eine Phakoemulsifikation aufgrund eines zu harten Linsenkernes nicht durchführbar, wird eine Extrakapsuläre Kataraktextraktion (ECCE) nötig. Nur sehr selten kann bei europäischen Patienten die Linsenkapsel nicht erhalten werden und eine Intrakapsuläre Kataraktextraktion (ICCE) muß durchgeführt werden.

Die Kataraktoperation wird heute fast ausschließlich in Lokalanästhesie durchgeführt: entweder durch oberflächliche und intrakammerale Lidocain-Gabe oder durch eine peri- bzw. retrobulbäre Injektion von Anästhetika.

### **1.4. Postoperative Komplikationen der Kataraktoperation**

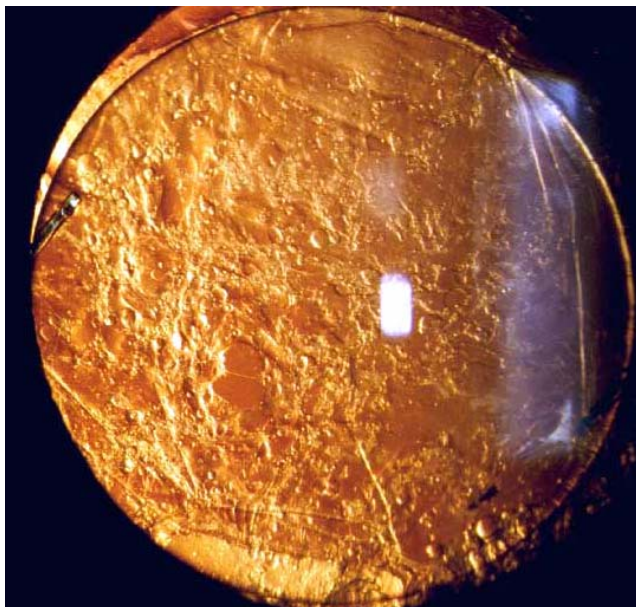
Postoperativ kann es, ebenso wie intraoperativ, zu Blutungen oder Entzündungen sowohl des äußeren als auch des inneren Auges kommen. Eine Endophthalmitis ist neben der Ablatio retinae die gefürchtetste Komplikation, da sie nicht nur die postoperative Funktion, sondern auch den Erhalt des Auges in Frage stellen kann. Weitere, weniger schwerwiegende Komplikationen nach einer Kataraktoperation sind der Anstieg

bzw. Abfall des intraokularen Druckes, ein Hornhaut- bzw. Netzhautödem, die Dislokation der implantierten Intraokularlinse (IOL) und eine Zunahme des Hornhautastigmatismus im Vergleich zum präoperativen Wert. Die bei weitem häufigste postoperative Komplikation der Kataraktoperation aber ist die Entstehung eines Nachstars. Auf ihn wird im folgenden Abschnitt ausführlich eingegangen.

#### **1.4.1. Der Nachstar – Definition, Inzidenz, Entstehung und Formen**

##### **1.4.1.1. Definition und Inzidenz des Nachstars**

Bei der Cataracta secundaria, auch Nachstar genannt, handelt es sich um eine Eintrübung der Linsenkapsel nach einer Kataraktextraktion.



**Abb. 1.2.: Nachstar** auf der Hinterkapsel im regredienten Licht

Der Nachstar ist eine sehr bedeutsame Langzeitkomplikation sowohl der Phakoemulsifikation als auch der Extrakapsulären Kataraktoperation (ECCE). Die Entwicklung eines Nachstars ist die Hauptursache für postoperativ erneut auftretende Visusdefizite. Zur Inzidenz des Nachstars sind in der Literatur sehr unterschiedliche Angaben zu finden. Sie variieren zwischen 10 und 50 % [6], [7]. Eine Abhängigkeit der Schnelligkeit und der Schwere einer Nachstarentwicklung von Operationstechniken, verwendeten Intraokularlinsen und auch von der Konstitution und dem Alter des Patienten ist bekannt [8]. So

beträgt für kataraktoperierte Kinder die Wahrscheinlichkeit, einen Nachstar auszubilden, bis zu 95 %. Mit zunehmendem Patientenalter nimmt die Häufigkeit der Nachstar-entwicklung ab [8].

#### 1.4.1.2. Pathogenese und Formen des Nachstars

Nach einer Kataraktextraktion können im Kapselsack bzw. im Auge verbliebene Linsenepithelzellen (LEC) proliferieren und nach einem Zeitraum von ein bis fünf Jahren zur Ausbildung eines Nachstars führen.

Nach Naumann [1] können zwei Formen des Nachstars unterschieden werden: die Cataracta secundaria simplex und die Cataracta secundaria accreta, wobei letztere nach Blutungen oder bei Entzündungen auftritt.

Die Cataracta secundaria simplex ist wiederum in einen *fibrotischen* und einen *regeneratorischen* Typ zu unterteilen:

Der *fibrotische Nachstar* ist dadurch ausgezeichnet, daß an der Linsenkapsel adhären-te Epithelzellen proliferieren und im Rahmen einer fibrösen Pseudometaplasie zu Myofibroblasten transformieren [4]. Es entsteht eine fibröse Matrix mit Kollagenfasern, Basalmembranneubildung und Hyaluronsäure-Produktion. Diese Zellproliferation nimmt ihren Ausgang von den Verbindungsstellen zwischen Vorder- und Hinterkapsel und dehnt sich auf der Innenseite der Hinterkapsel nach zentral, zur optischen Achse hin, aus. Auch eine Faltenbildung der Hinterkapsel durch die Kontraktion der Myofibroblasten ist möglich. Die Epithelproliferation kann desweiteren zum Verschluß der vorderen Kapsulotomie mit Kontraktion und Fältelung der Vorderkapsel führen.

Auch dem *regeneratorischen Nachstar* liegt ein Transformationsprozeß von Linsenepithelzellen zugrunde: Die im Äquatorbereich verbliebenen proliferierenden und auf die Hinterkapsel migrierenden Epithelzellen werden zu sogenannten Wedl-Blasenzellen. Dabei handelt es sich um abnorme globuläre Faserzellen, die ein kernhaltiges und vakuolisiertes Plasma aufweisen. Diese Zellen bilden Konglomerate auf der Vorderfläche der Hinterkapsel, wo sie zu einer Trübung in der optischen Achse führen. Diese Gebilde werden als Elschnig-Perlen bezeichnet. Kommt es ausschließlich im Bereich des Äquators zu einer Epithelproliferation, spricht man von einer Soemmerring-Ringkatarakt.

Eine Cataracta secundaria accreta entsteht am häufigsten nach einer extrakapsulären

Kataraktextraktion (ECCE) bei Iridozyklitis. Hier besteht der Nachstar neben den Linsenepithelien und der Kapsel auch aus Entzündungszellen und Zellen benachbarter okulärer Strukturen. Es kommt zur Bildung einzelner Synechien oder gar solider bindegewebiger Plaques.

Allgemein stellt die Entwicklung eines Nachstars eine Wundheilung nach der Eröffnung der Linsenkapsel dar. Die Schwere und Dauer der Störung der Blut-Kammerwasser-Schranke während und nach der Kataraktchirurgie beeinflusst die Stärke von Proliferation, Migration und Metaplasie/Transformation der Linsenepithelzellen als Ausdruck dieser Wundheilung [9]. Cytokine des Serums können bei der Störung der Blut-Kammerwasser-Schranke intraokular wirken. Auch liegen Ergebnisse vor, die darauf hinweisen, daß Linsenepithelzellen (LEC) selbst bestimmte Cytokine produzieren, die die Wundheilung bzw. Nachstarbildung modulieren: In Linsenepithelien, die während der Kapsulotomie bei der Kataraktoperation gewonnen wurden, konnten EGF, FGF, IL-1 und TNF- $\alpha$  immunhistochemisch nachgewiesen werden. Zusätzlich zu diesen Faktoren wurden in den proliferierten LEC von autopsierten post-mortem-Augen TGF- $\beta$  1, IL-6 und PGE<sub>2</sub> gefunden [10]. IL-1 und b-FGF stimulieren die Mitose der LEC, während TGF- $\beta$  diese hemmt. IL-1, b-FGF und TGF- $\beta$  fördern die Kollagensynthese humaner LEC [11], [12], [13]. IL-1 und IL-6, intrakameral oder intravitreal injiziert, führen zu einer okulären Entzündung [14]. Auch eine autokrine oder parakrine Sekretion dieser Cytokine als Reaktion auf die durch die Operation ausgelöste Entzündung mit dem Ziel der Wundheilung ist daher wahrscheinlich.

Kurosaka et al. [15] konnten zeigen, daß LEC, die zu myofibroblastenähnlichen Zellen transformiert waren,  $\alpha$ -SMA (smooth muscle actin) exprimierten. Expression von  $\alpha$ -SMA und die Kontraktion boviner LEC auf Kollagen nahmen unter Anwesenheit von TGF- $\beta$ <sub>2</sub> zu, wohingegen b-FGF zu einer Abnahme dieser Parameter führte. Die Autoren schlossen daraus, daß  $\alpha$ -SMA für die Kontraktion der Kapselfibrose verantwortlich ist, moduliert durch Wachstumsfaktoren wie TGF- $\beta$ <sub>2</sub> und b-FGF.

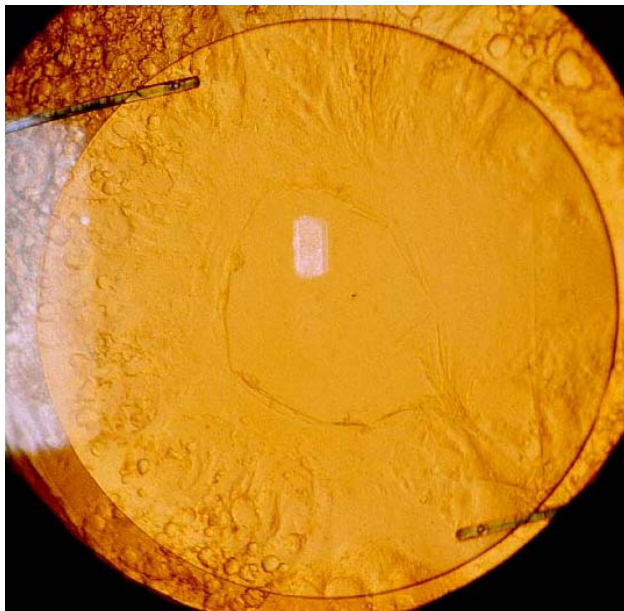
Ein sehr förderlicher Einfluß auf Zellproliferation und -differenzierung und damit auch auf die Nachstarbildung konnte für Transferrin gezeigt werden. Dieses hat außerdem bakteriostatische, antioxidative und antiinflammatorische Eigenschaften. Linsenepithelien stellen den Hauptbildungsort für das Transferrin des Kammerwassers dar [16]. In Nachstar-Kapseln mit sich regenerierendem Linsengewebe (Linsenkapseln nach

vorderer Kapsulotomie) wurden fünffach höhere Sekretionsraten an Transferrin als in der Kontrollgruppe (intakte Linsen kapseln des kontralateralen Auges) gefunden [17].

Eine weitere wichtige Gruppe für die Entstehung eines Nachstars sind Zell-Adhäsions-Moleküle (CAM). Humane Linsenepithelzellen exprimieren ICAM-1, CD-44 und Integri-ne [18]. Diese CAM sind für die Adhäsion der LEC an der Linsen kapsel verantwortlich. Erst durch diese Adhäsion ist die Zelle in der Lage zu proliferieren, zu migrieren und sich zu differenzieren. Bei einer Ablösung der Zelle käme es zur Apoptose der Zelle durch Stimulierung von Apoptose-Signalen oder Blockade von Überlebens-Signalen [19], [20].

#### **1.4.2. Therapie des Nachstars**

Zwei Möglichkeiten stehen zur Behandlung eines Nachstars zur Verfügung. Die am häufigsten verwandte Methode ist die der YAG-Kapsulotomie. Dabei wird in die hintere Linsen kapsel mit dem Nd:YAG-Laser ein ca. 4 mm großes Loch geschossen. Dieses sollte direkt in der optischen Achse liegen. Dem Patienten wird dadurch wieder ein kla-res Sehen möglich, der Visus steigt im Idealfall wieder auf direkt postoperativ erreichte Werte an.



**Abb. 1.3.:** Zustand nach YAG-Kapsulotomie bei ausgeprägtem Nachstar



Die YAG-Kapsulotomie ist eine relativ einfach und schnell durchzuführende Methode, bei der der Bulbus nicht eröffnet wird. Allerdings besteht das Risiko einer Ablatio retinae, deren Inzidenz nach ECCE durch die Lasertherapie etwa um das Vierfache erhöht ist – unabhängig von bestehenden Risikofaktoren [21]. Ein solch erhöhtes Risiko liegt ein Jahr postoperativ allerdings nicht vor, wenn mittels Phakoemulsifikation operiert wurde [22]. Die Gefahr einer Ablatio retinae nimmt deutlich zu, wenn Patienten Risikofaktoren, wie z.B. eine Myopie aufweisen. Wegen dieses hohen Risikos kommt für myope Patienten nur eine Nachstar-Absaugung in Frage. Dieses bulbuseröffnende Verfahren erfordert eine ausreichende Lokalanästhesie, in der Regel eine Peribulbäranästhesie. Diese birgt jedoch wiederum die Gefahren einer Bulbusperforation, eines retrobulbären Hämatoms und einer Alteration des Nervus opticus. Die Nachstar-Absaugung selbst kann als bulbuseröffnender Eingriff zu intraokularen Blutungen und Entzündungen führen. Da es sich um ein sehr sorgfältig durchzuführendes und damit zeitintensives Verfahren handelt, welches oft 20-30 Minuten in Anspruch nimmt, sind Schädigungen des Hornhautendothels möglich. Durch die Kapselpolitur und Spülung kann es zu Kapselrupturen mit den bekannten Folgen kommen. Hinzu kommt, daß es oft schwierig ist, die Nachstar-Absaugung befriedigend vorzunehmen, da es häufig bereits zu Verklebungen zwischen Vorder- und Hinterkapsel bzw. zwischen der Kapsel und der IOL gekommen ist. Der Erfolg dieser Therapie ist nur vorübergehend, da – wie bei der Kataraktoperation – immer Linsenepithelien im Kapselsack verbleiben und sich so wiederum ein Nachstar bilden kann.

Weitere mögliche Komplikationen einer YAG-Kapsulotomie sind die Zerstörung der Optik der IOL bei falscher Fokussierung des Lasers, die Entstehung eines zystoiden Makulaödems und intraokulare Entzündungen.

#### **1.4.3. Prävention des Nachstars**

Da sowohl die YAG-Kapsulotomie als auch die Nachstar-Absaugung die genannten Risiken bzw. Mängel aufweisen, werden seit einigen Jahren verstärkt Möglichkeiten zur Prävention des Nachstars gesucht.

Drei Wege, die Entstehung eines Nachstars zu beeinflussen, haben sich dabei herauskristallisiert:

1. Die chirurgische Vorgehensweise/mechanische Ansätze,
2. Material und Design der Intraokularlinse und
3. Pharmazeutika.

#### 1.4.3.1. Chirurgische Vorgehensweise bzw. mechanische Ansätze

Im Vordergrund eines ersten mechanischen Ansatzes zur Prävention des Nachstars steht der Versuch, *alle* Linsenepithelzellen (LEC), das Nachstarsubstrat, vollständig zu entfernen. Hierzu werden *operative Verfahren* wie Kapselpolitur und Aspiration der Epithelien angewandt. Es zeigt sich aber, daß eine vollständige Entfernung der LEC aus dem Kapselsack nicht zu erzielen ist. Auch nimmt ein solches Vorgehen zusätzliche operative Zeit in Anspruch und führt zu stärkeren intraokularen Manipulationen, so daß die Gefahr iatrogener Traumata zunimmt und die Störung der Blut-Kammerwasser-Schranke ausgeprägter ist.

Ein zweiter mechanischer Ansatz gründet sich auf die Beobachtung der Kontakthibition der Proliferation und Migration von LEC: In Kulturschalen konnte beobachtet werden, daß Zellen, die auf einem diskontinuierlichen rechteckigen Boden wuchsen, bei Erreichen der Ränder des Wells nicht weiter proliferierten. Bei U-förmigen Böden hingegen kam es zu keiner Kontakthibition [23]. Dieses Phänomen führte zu Untersuchungen zur Nachstarinhibition mittels Kapselspannrings mit scharfen Kanten. Eine signifikante Reduktion des Nachstars war nachweisbar [24], [25]. Zunächst wurde dieser Erfolg auf eine Kompression der LEC zurückgeführt. Es konnte jedoch gezeigt werden, daß sowohl die *scharfen Kanten* des Ringes (Winkelbildung) als auch die *Spannung der Kapsel* und die dadurch erzielte Kontakthibition der LEC für diesen Effekt verantwortlich ist [23]. Beides setzt eine gut zentrierte kontinuierliche kurvilineare *Kapsulorrhexis* voraus, die kleiner als die Optik der IOL sein muß [26]. Aber auch die zusätzliche Implantation eines Kapselspannrings zur IOL bedeutet eine Verlängerung der Operationszeit und eine mögliche Vergrößerung des Traumas; auch entstehen dadurch weitere Kosten.

Ein zweiter Weg zur Verhinderung der Nachstarbildung wird durch die Optimierung von Material und Design der IOL beschritten.

#### 1.4.3.2. Material und Design der Intraokularlinse

Ebenso wie unter 1.4.3.1. für Kapselspannrings beschrieben, hat auch das Design der IOL Auswirkungen auf die Entstehung eines Nachstars. So ist für scharfkantige Intraokularlinsen (IOL) eine niedrigere Nachstarrate als für IOL mit runden Rändern gezeigt worden [27], [28]. Ebenfalls günstig sind eine hintere Konvexität und ein steiler Haptikwinkel der IOL [23].

Der Einfluß des Materials der IOL ist noch nicht befriedigend geklärt. Unter Zellkulturbedingungen adherieren mehr Zellen an PMMA als an anderen Materialien wie Silikon oder HEMA [29]. Dies legte die Vermutung nahe, daß PMMA-Linsen zu einer stärkeren Nachstarentwicklung führen als Intraokularlinsen anderer Materialien.

In klinischen Studien konnte diese Vermutung jedoch bisher weder bestätigt noch widerlegt werden, da die Untersuchungen stets *zwei* Variablen beinhalten: *Design* und *Material*, so daß eine gesicherte Aussage über die Nachstarrate bei PMMA-, Silicon- und Acryl-Linsen noch nicht möglich ist. Lediglich *eine* Untersuchung an vier Augenpaaren (Kaninchen) mit einer Acry-Sof-IOL gegenüber einer PMMA-IOL gleichen Designs zeigte 3 Wochen postoperativ keine Unterschiede in der Ausbildung eines Nachstars [30]. Dies könnte ein Hinweis darauf sein, daß vorwiegend das Design der IOL bestimmend für die Entstehung eines Nachstars ist.

Nicht zu vernachlässigen ist auch die *Biokompatibilität* der verwendeten Materialien, da eine höhere Verträglichkeit zu weniger Kapselfibrose führt. In einer klinischen Studie zeigte sich diesbezüglich eine Überlegenheit der Acry-Sof-IOL gegenüber PMMA- bzw. Silicon-IOL [31].

#### 1.4.3.3. Pharmazeutika

Der dritte Lösungsansatz beinhaltet die Prävention des Nachstars mittels Pharmazeutika. Die unterschiedlichen Methoden lassen sich nach den verschiedenen Phasen einteilen, die auf dem Weg zur Entstehung eines Nachstars zu durchlaufen sind: Zunächst die Adhäsion der LEC an der Kapsel bzw. der IOL, später deren Migration, Proliferation und Differenzierung. Eine Reihe von Pharmaka, die auf einer oder mehrerer dieser Stufen in die Nachstarentstehung eingreifen können, wurden bereits untersucht:

Zunächst waren dies die *Antimetaboliten*, die somit in die Proliferation der Zelle eingreifen: Daunomycin [32], [33], [38], Daunorubicin [34], 5-Fluorouracil [35], [36], [37], [38], Methotrexat [39], Mitomycin [40] und Colchicin [38], [41]. Neben einer kompletten Inhibition des Nachstars kam es allerdings auch zu toxischen Wirkungen auf das Hornhautendothel, pigmentierte Ziliarepithelzellen und retinale Zellen.

Mitomycin C ist die einzige Substanz, die derzeit klinisch eingesetzt wird – allerdings nicht in der Kataraktchirurgie sondern in der Glaukom-Chirurgie. Durch eine subkonjunktivale Applikation soll eine Vernarbung des angelegten Filterbereiches verhindert werden. Kam Mitomycin C auf diese Weise in der kombinierten Katarakt- und Glaukom-Chirurgie zum Einsatz, war eine Reduktion des Nachstars zu verzeichnen [42].

Desweiteren versuchte man, Linsenepithelzell-spezifische *Immunotoxine und Zytotoxine* einzusetzen, welche wiederum die Proliferation der LEC hemmen. Anti-Transferrin-Antikörper reduzierten die Überlebensrate von LEC in vitro [43]. Transferrin ist bekannt als ein Überlebensfaktor für LEC [43]. Auch konnte über die Kopplung an monoklonale Antikörper gegen humane Antitransferrin-Rezeptoren das Immunotoxin Ricin eine proliferationshemmende Wirkung auf humane LEC ausüben [44]. Klinische Erfahrungen wurden bereits 24 Monate postoperativ mit an monoklonale antihumane Antikörper konjugiertem Ricin A gesammelt. Es handelt dabei um einen Protein-Synthese-Inhibitor. Clark et al. [45], sahen eine signifikante Hemmung des Nachstars, aber auch frühpostoperative Vorderkammerreizzustände; auch die Hornhaut-Pachymetrie ergab höhere Werte in der Toxin-behandelten Patientengruppe. Sehr vielversprechend sind auch Berichte über die Implantation von FGF<sub>2</sub>-Saporin-beschichteten HSM-PMMA IOL im Kaninchenmodell [46]. Saporin blockt ebenfalls die Protein-Synthese der Zelle und gelangt intrazellulär durch Bindung an FGF<sub>2</sub>-Rezeptoren. Auch kann Saporin, an Polylysin gebunden, perioperativ in die Linsenkapsel injiziert werden. Polylysin bindet an das Heparansulfat der Linsenkapsel. So kam es zu einer Verzögerung des Wachstums von LEC [47]. Ohne andere okuläre Strukturen zu schädigen, war der Nachstar deutlich geringer als in der Kontrollgruppe. Desweiteren konnte die Proliferation von LEC in vitro durch lens epithelial necrosis factor inhibiert werden [48]; ebenso durch einen LEC-Antikörper [49].

Auch mit recht *unspezifischen Substanzen* gelang eine ausgeprägte Nachstarhemmung – v.a. durch eine negative Beeinflussung der Proliferation und Differenzierung der LEC. Es sind hier v.a. Indomethacin [50], [51] (in vitro), Diclofenac [52], [53] (in vitro) und Cyclosporin A [52] (in vitro) zu nennen. Mit Indomethacin beschichtete IOL waren im Tiermodell [34] erfolgreich, bei einer verzögerten Freisetzung war jedoch [34] kein den Nachstar reduzierender Effekt nachweisbar. Interpretiert wurde dieses überraschende Ergebnis als ein Gewöhnungs- bzw. Anpassungseffekt der LEC.

In vitro konnte auch durch mit Thapsigargin, einem Inhibitor der Ca<sup>2+</sup>-ATPase des endoplasmatischen Retikulums, beschichtete PMMA-IOL ein ausreichender Effekt erzielt werden [54].

Desweiteren ist die Inhibition der Adhäsion und Migration von LEC mittels löslicher RGD-Peptide, kompetitiven Hemmern der Integrine der LEC, gezeigt worden [55], [56], [57], [58] (s. 1.5.). Die Wirkung eines solchen (zyklischen) RGD-Peptids auf die Nach-

starbildung in vitro ist Gegenstand der hier vorliegenden Arbeit. Daher soll in Kapitel 1.5. zunächst auf die Mechanismen der Zelladhäsion, insbesondere durch Integrine, eingegangen werden. Anschließend erläutert Kapitel 1.6. die Interaktion von RGD-Peptiden mit Integrinen.

### **1.5. Integrine und ihre Bedeutung für die Zelladhäsion**

Die Adhäsion einer Zelle auf biologischem oder synthetischem Material ist durch vier aufeinanderfolgende Schritte gekennzeichnet: Zunächst kommt es zu einem Kontakt zwischen Zelle und Oberfläche. Wenn sich dann die Zelle auf dieser Oberfläche „ausbreitet“, werden intrazelluläre Strukturen, wie z.B. die Mikrotubuli, reorganisiert, um so eine möglichst große Kontaktfläche zwischen beiden Adhäsionspartnern zu ermöglichen. In einer dritten Etappe schließlich entstehen fokale Adhäsionen, indem sich zwischen intrazellulären Proteinen und bestimmten chemischen Gruppen der Adhäsionsoberfläche chemische Brücken ausbilden, durch Löcher in der Zellmembran hindurch. Die Zelle produziert daraufhin in der vierten Etappe eine extrazelluläre Matrix, durch die ihre Adhäsion auf der Oberfläche dauerhaft möglich ist.

Auf Kunststoff-Oberflächen ist die vierte Etappe der Adhäsion mediiert durch zugefügte extrazelluläre Matrix. Die Zelle ist aber auch in der Lage, selbst extrazelluläre Matrixproteine zu bilden, z.B. Fibronectin durch humane Fibroblasten – bereits nach zehn Minuten auf einer nicht-biologischen Oberfläche [59]. Humane LEC sind in Langzeitkulturen fähig, eine Linsenkapsel zu synthetisieren, die Kollagen IV und Laminin enthält [60].

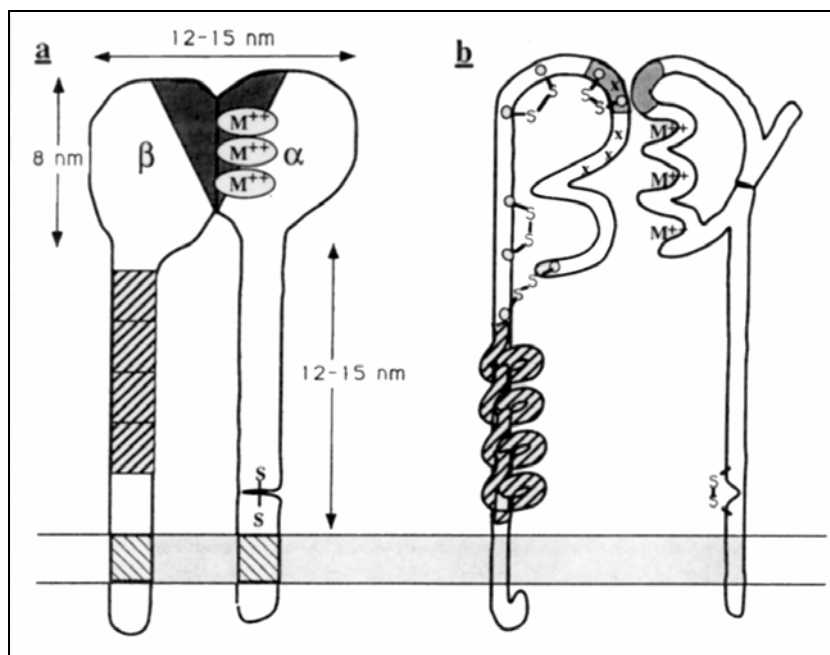
Eine Adhäsion auf biologischen Oberflächen, wie sie die Adhäsion zwischen der Linsenepithelzelle und der Kapsel darstellt, wird ebenfalls durch eine aus komplexen Makromolekülen bestehende extrazelluläre Matrix ermöglicht. Diese Makromoleküle unterteilen sich in zwei große Gruppen: Glykosaminoglykane und Proteine. Letztere lassen sich wiederum in Struktur- bzw. Adhäsionsproteine gliedern. Strukturproteine sind z.B. Kollagen und Elastin, Adhäsionsproteine z.B. Kollagen, Fibronectin, Fibrinogen, Vitronectin und Laminin. Strukturproteine sind in dreidimensionalen Netzen organisiert und gewährleisten Gewebestabilität.

Adhäsionsproteine sind entscheidend an der Zelladhäsion und damit dem Wachstum der Zelle beteiligt. Zellen, denen eine Adhäsion an extrazellulären Oberflächen nicht gelingt, gehen durch Apoptose zugrunde [19], [61].

Adhäsionsproteine weisen u.a. eine kleinste gemeinsame funktionelle Sequenz an der

Stelle der Adhäsion mit einer Zelle auf: die drei Aminosäuren Arginin, Glycin und Asparagin, im Einbuchstabencode kurz „RGD“ [62].

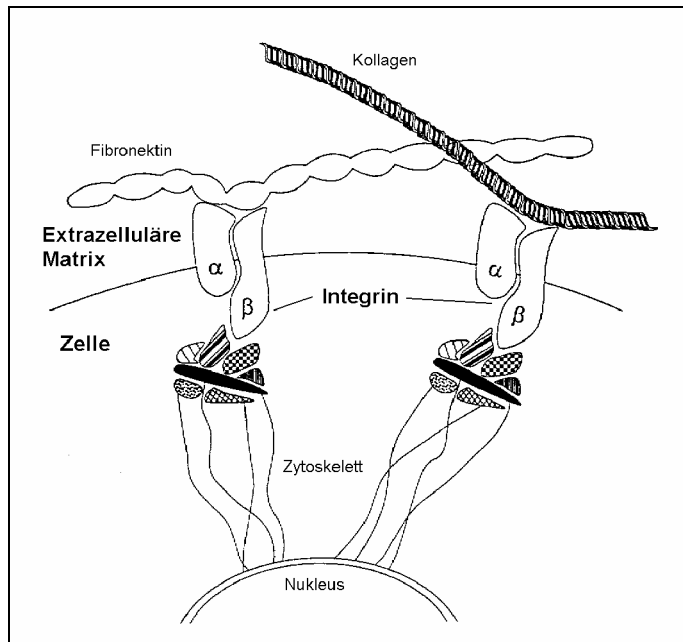
Auch die Zelle besitzt Strukturen, die für das Zustandekommen einer Adhäsion an extrazellulärem Material notwendig sind: die Adhäsionsmoleküle. Mit Bezug auf das Thema der vorliegenden Arbeit soll hier insbesondere auf die sogenannten Integrine eingegangen werden.



**Abb. 1.4.: Die Struktur der Integrin-Rezeptoren.** a) zeigt eine Übersichtsdarstellung des Aufbaus, wie er durch Elektronenmikroskopie bekannt ist: die Cystin-reichen repeats der  $\beta$ -Untereinheit (schraffiert) und die Metallbindungsstellen in der  $\alpha$ -Untereinheit ( $M^{++}$ ). Der schwarz ausgefüllte Bereich repräsentiert die Liganden-Bindungsregion, die von beiden Untereinheiten gebildet wird. b) verdeutlicht den chemischen Aufbau der Polypeptid-Ketten (nach Hynes [63]).

Integrine sind transmembranäre Glykoproteine, die aus einer  $\alpha$ - und einer  $\beta$ -Untereinheit bestehen (s. Abb. 1.4.) [63]. Beide sind nicht kovalent verbunden. Integrine haben eine kurze intrazelluläre und transmembranäre Domäne, die die Verbindung zum Zytoskelett herstellt, und eine, für die Funktion der Integrine als Rezeptoren sehr wichtige, lange extrazelluläre Domäne.

Da insbesondere die  $\alpha$ -Kette eine große Heterogenität zeigt, sind heute viele Subgruppen von Integrinen bekannt. Die  $\alpha$ -Kette kann eine Domäne haben, die mit Kollagen interagiert.

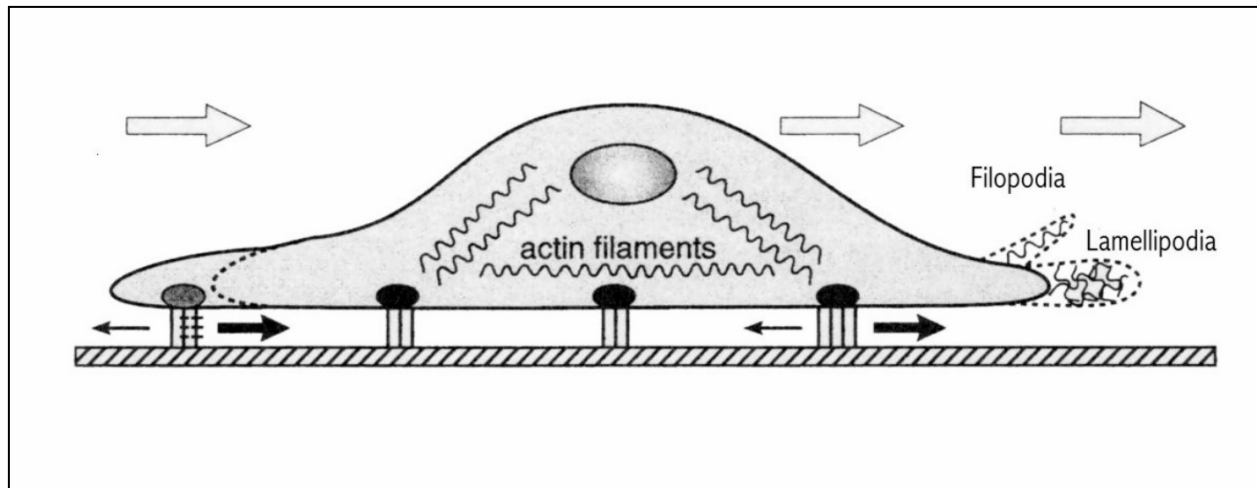


**Abb. 1.5.:** Schematische Darstellung der molekularen Mechanismen während der **Adhäsion einer Zelle an extrazellulärer Matrix** (hier exemplarisch Kollagen und Fibronectin): Durch den Kontakt von zellulären Integrinen mit den Adhäsionsproteinen der extrazellulären Matrix kann es zu einer Neuordnung des Zytoskeletts kommen, es werden Signale an den Nucleus übermittelt und so die Genexpression beeinflusst (nach Yue [64]).

Für die Bindung der Zelle an Liganden mit Hilfe bestimmter Integrine der Zelle ist u.a. das Vorhandensein einer RGD-Sequenz auf den Adhäsionsproteinen der extrazellulären Matrix nötig (s. Abb. 1.5.). Dabei kann sowohl eine Bindungsstelle (RGD-Sequenz) mehrere Integrine binden als auch ein Integrin mehrere Liganden. Für das Zustandekommen einer spezifischen Adhäsion müssen die Integrine reguliert werden, denn es können mehrere verschiedene Integrine auf einer Zelle vorhanden sein. Dieser Prozeß wird als „Inside-out“-Mechanismus bezeichnet. Er bezeichnet die Regulation der Affinität und Konformation des Rezeptors, ausgehend vom Inneren der Zelle. Ebenso können intrazelluläre Veränderungen durch Binden von Liganden an den Rezeptor ausgelöst werden: Dieser Vorgang wird „Outside-in“ genannt. So können Liganden die intrazelluläre Genexpression beeinflussen (s. Abb. 1.5.).

Dabei werden RGD-Sequenzen v.a. von den Integrinen  $\alpha_v\beta_1$ , aber auch von  $\alpha_5\beta_1$ ,  $\alpha_v\beta_5$ ,  $\alpha_{IIb}\beta_{IIIa}$  (auch: GPIIb/IIIa) und  $\alpha_v\beta_3$  erkannt [63], [65].

Integrine sind allerdings nicht nur zur Adhäsionsinduktion, sondern auch zur Migration der Zelle vonnöten, wie Abb. 1.6. verdeutlicht [66].



**Abb. 1.6.:** Verschiedene **Mechanismen der Zell-Migration:** Zunächst kommt es zur Extension von Lamellipodia und Filopodia, zeitgleich mit der lokalen Actin-Polymerisation des intrazellulären Aktins. So wird die Protrusionskraft aufgebaut. Es werden dann neue fokale Adhäsionen an der Zellfront ausgebildet; diese persistieren, bis sie wiederum die Zellrückseite erreicht haben. Integrine spielen hierbei eine wesentliche Rolle. Neben der Extension der Zelle ist der Aufbau einer Kontraktionskraft vonnöten, um die Zelle vorwärts zu bewegen (Interaktion von Myosin mit Aktinfilamenten). Bei der Ablösung der Zellrückseite vom Adhäsionssubstrat wird der Großteil der Integrine auf diesem Substrat zurückgelassen. Sie können sich dann auf der Zelloberfläche verteilen und per Endozytose in der Zelle recycelt werden. Auch eine Neusynthese von Integrinen tritt ein. So können Integrine intrazellulär zur Zellfront transportiert werden und stehen dort für neue fokale Adhäsionen zur Verfügung (nach Lauffenburger [66]).

Zelladhäsionen werden jedoch nicht ausschließlich über die RGD-Sequenz als Adhäsionsprotein und durch Integrine als Adhäsionsmoleküle induziert.

Bezogen auf die Gruppe der Adhäsionsproteine sind für Fibronectin u.a. auch korrespondierende REDV-Sequenzen, Peptide I und II, für Laminin u.a. YIGSR-, PDSGR- und LGTIPG-Sequenzen und für Kollagen Typ I u.a. auch DGEA-Sequenzen gefunden worden. Auch können, wenn RGD-Sequenzen vorliegen, diese durch unterschiedliche Substituenten mit unterschiedlichen Integrinen interagieren: Für Kollagen Typ I sind z.B. die Arg-Gly-Asp-Thr-Pro- und die Ser-Arg-Gly-Asp-Thr-Gly-Sequenz beschrieben. Auch ein und dieselbe RGD-Sequenz kann mit unterschiedlichen Integrinen interagieren (für Fibrinogen: Gly-Arg-Gly-Asp-Ser mit  $\alpha_{II}\beta_3$ ,  $\alpha_v\beta_3$ ,  $\alpha_3\beta_1$ ,  $\alpha_v\beta_1$ ) bzw. ein Integrin mit verschiedenen RGD-Sequenzen (für Fibrinogen:  $\alpha_v\beta_3$  sowohl mit der Arg-Gly-Asp-Ser- als auch mit der Arg-Gly-Asp-Phe-Sequenz) [67].

Die für die Anheftung der Linsenepithelzelle an die Linsenkapsel nötigen Adhäsionsproteine befinden sich auf dem Fibronectin, Laminin, Kollagen und Entaktin der Kapsel. Hierbei wird die Adhäsion der Linsenepithelzelle vor allem durch Kollagen IV, aber auch



durch Laminin und Fibronektin induziert. Die Migration hingegen ist wesentlich von Fibronektin abhängig, weniger von Kollagen IV und Laminin [68].

Neben verschiedenen Adhäsionsproteinen der extrazellulären Matrix sind auch unterschiedliche Adhäsionsmoleküle der Zelle bekannt: Für die Linsenepithelzelle sind dies neben  $\beta_1$ -Integrinen ICAM-1 und CD-44 [18].

## **1.6. Bisherige Untersuchungen zur Wirkung von RGD-Peptiden**

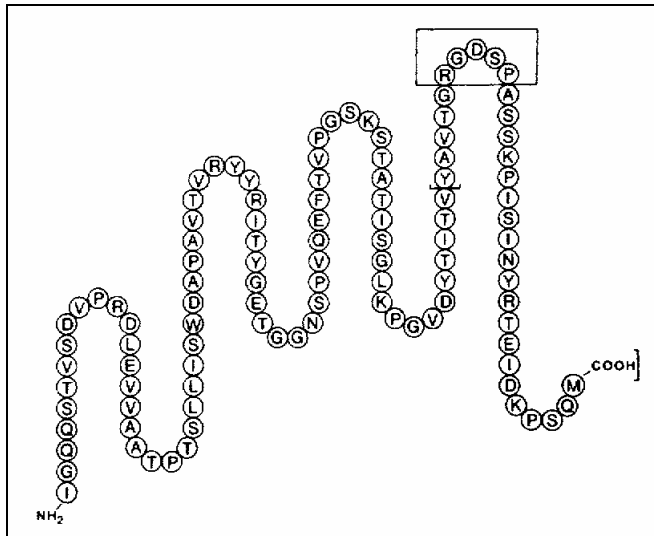
Um Einfluß auf die Adhäsion von Zellen nehmen zu können, zum Beispiel durch eine Substanz, die eine Bindung mit den Integrinen eingeht, wurde zunächst der Aufbau des Teils der Extrazellulären Matrix näher bestimmt, der für die Adhäsion der Zelle verantwortlich ist.

### **1.6.1. RGD-Peptide**

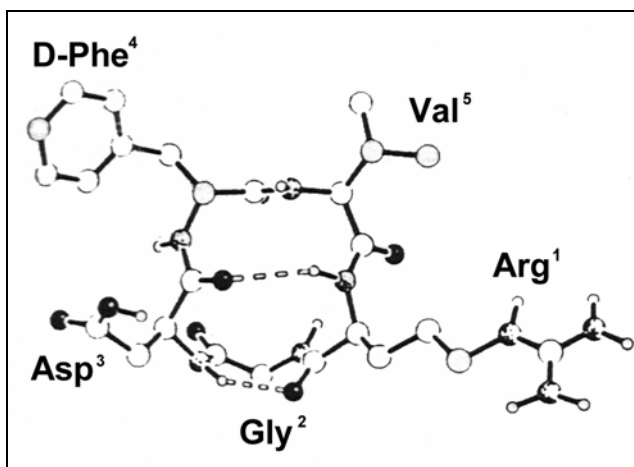
Zur Untersuchung der für die Zelladhäsion entscheidenden Bestandteile der extrazellulären Matrix wurde Fibronektin als Prototyp verwendet. Bereits 1982 konnten Pierschbacher et al [69] die komplette Aminosäuresequenz des Adhäsionsfragmentes von Fibronektin darstellen (s. Abb. 1.7.).

Von diesen 108 Aminosäuren erwies sich eine Sequenz aus lediglich drei Aminosäuren als unabdingbar für das Zustandekommen einer Zellanheftung: die Arginin-Glycin-Asparagin-Sequenz (RGD) [70], [71]. Ebenso wurde gezeigt, daß keine der drei Aminosäuren ersetzt werden konnte, wollte man die Funktion erhalten. Mit synthetisch hergestellten löslichen RGD-Peptiden fand man auch für Verbindungen, die am  $\text{NH}_2$ - bzw.  $\text{COOH}$ -wärtigen Ende der Adhäsionsproteine substituiert waren, gute adhäsionshemmende Effekte (GRGDSPA, GRGDSPC, GRGDAPC) [70], [71]. Dabei wirkte Gly-Arg-Gly-Asp-Ser-Pro (GRGDSPA) stärker inhibitorisch auf die Zelladhäsion als Arg-Gly-Asp-Ser (RGDS).

Gurrath und Mitarbeiter untersuchten 1992 die Adhäsionsinhibition von Tumorzellen an Laminin P1 und Vitronektin im Beisein verschiedener synthetischer RGD-Peptide [72]. Dabei zeigte sich eine deutliche Überlegenheit von zyklischem  $\text{RGD}_{\text{D}}\text{FV}$  (cyclo(Arg-Gly-Asp-d-Phe-Val)) (s. Abb. 1.8.) und zyklischem  $\text{RGDF}_{\text{D}}\text{V}$  gegenüber anderen untersuchten RGD-Peptiden. Ersteres war potenter bezüglich der Zell-Adhäsionshemmung an Vitronektin.



**Abb. 1.7.:** Die Struktur der **Zelladhäsions-Domäne von Fibronectin**. Markiert ist die RGD-Sequenz (nach Pierschbacher [70]).



**Abb. 1.8.:** **cyclo(RGDdFV)** (nach Gurrath [72]).

Auch die Arbeitsgruppe um Noiri [81] sah unter Einwirkung von cRGDdFV eine starke Adhäsionshemmung renaler Epithelzellen von Affen auf Laminin; auf Fibronectin waren 10fach höhere Konzentrationen für einen vergleichbaren Effekt nötig.

Desweiteren wurde ein zyklisches RGDFdV-Peptid seinem linearen Analogon gegenübergestellt. Die adhäsionshemmende Wirkung auf Zellen an Laminin P1 bzw. Vitronectin ließ sich durch Zyklisierung stark steigern [72]. Gurrath et al. fanden ihre Hypothese bestätigt, daß eine zyklische Peptid-Konformation die für eine Rezeptorbindung nötige Konformation besser imitieren kann als ein lineares Peptid – wohl durch eine Abnahme der Flexibilität des Peptids.

Die Ringbildung, aber nicht notwendigerweise die Lokalisation der RGD-Sequenz in einer gestreckten oder gewundenen Konformation, steigert die Affinität für die Rezeptor-Bindung. Die Position der D- und R-Seitenketten, ihre Chiralität und das Austauschen von G gegen A beeinflussen die Aktivität des entsprechenden Peptids moderat oder stark, abhängig von der Ringgröße. Variationen der spacer residues (L,V) üben nur einen sehr gering modulierenden Effekt aus [72], [73].

Ein Vorteil der geringen Größe der löslichen synthetischen Peptide könnte in der sehr schwachen Antigenität bestehen.

Eine alternative bzw. ergänzende Erklärung für die adhäsionshemmende Eigenschaft der RGD-Peptide sieht nicht die Hemmung der Integrin-Ligand-Bindung als ursächlich an, sondern die Auslösung von Apoptosevorgängen in der Zelle [74]. Buckley et al. konnten zeigen, daß RGD-Peptide intrazellulär gelangen und dort durch eine Konformationsänderung von Pro-Caspase-3 deren Autoprocessing und Aktivierung bewirken. So nimmt schließlich die Konzentration der für die Apoptose einer Zelle verantwortlichen Caspase-3 zu. Die Zellen zeigten dann eine DNA-Fragmentierung und charakteristische morphologische Eigenschaften der Apoptose. Auch ein intrazelluläres Target für RGD-Peptide wurde in Caspase-3 gefunden.

Besonders interessant ist die Beobachtung der Autoren, daß eine Apoptose auch vor der Ablösung der Zellen zu induzieren war. Bisher war die Anoikis, der Zelltod durch Unterbrechung der Zell-Matrix-Interaktion von „anchorage-dependent cells“, als Verlust von Integrin-medierten Überlebenssignalen gewertet worden. Eine Untersuchung von auf Kollagen-1 kultivierten Lungen-Fibroblasten (diese Zelladhäsion ist RGD-unabhängig) zeigte eine Caspase-3-Aktivierung und Apoptose auch der adhären Zellen.

### ***1.6.2. Untersuchungen zur Nachstarprävention mittels RGD-Peptiden im Bereich der Ophthalmologie***

Wie unter 1.5 erläutert, führen RGD-Sequenzen, die an extrazellulären Matrixproteinen „fixiert“ sind, bei Verbindung mit Integrinen der Zelle zu deren Adhäsion auf der Matrixoberfläche. Lösliche RGD-Sequenzen hingegen hemmen die Adhäsion der Zelle, indem sie die Integrine kompetitiv blockieren. Damit stehen diese für eine Bindung an RGD-Sequenzen der extrazellulären Matrix nicht mehr zur Verfügung. Außerdem gibt es Hinweise, daß eine direkte Auslösung von Apoptosevorgängen durch RGD-Peptide

möglich ist. Auch auf diese Weise käme es dann zu einer Hemmung von Adhäsion, Migration, Proliferation und Differenzierung der Linsenepithelzelle.

Es wurde versucht, diese adhäsionshemmende und/oder apoptoseauslösende Eigenschaft löslicher RGD-Sequenzen zur Nachstarreduktion bzw. kompletten Prävention zu nutzen. Verschiedene Peptide, als Trägersubstanz der funktionell wirksamen RGD-Sequenz, sind entwickelt worden. Als besonders wirksam haben sich die zyklischen Formen (gegenüber den Monomeren) erwiesen. Es handelt sich um sehr kleine Moleküle, deren RGD-Träger-Peptid keine Wirkung auf die Adhäsion, Migration und Proliferation der Zelle haben soll.

In den bisher dazu durchgeführten Untersuchungen konnte Folgendes gezeigt werden:

1. Eine **Adhäsionshemmung** der Linsenepithelzellen ist durch RGD-Peptide möglich. Dies gilt sowohl für die Adhäsion auf bovinen Vorderkapseln (bovine LEC) als auch auf einzelnen Bestandteilen von Linsenkapseln (humane LEC), wie Fibronectin und Laminin [55], [56], [57], [58].
2. Auch eine **Proliferationshemmung** boviner LEC ist durch RGD-Peptide zu erzielen. Durch verschiedene Untersuchungen konnte dieser Effekt auf die Zellen bei kontinuierlicher und *langdauernder* Einwirkung des Peptids belegt werden [58], [55], [56]. Aussagen über die Auswirkungen einer nur *kurzzeitigen* Inkubation mit RGD-Peptid liegen dagegen nicht vor. Auch über eine mögliche Proliferationshemmung *humaner* LEC gibt es bisher keine Erkenntnisse.
3. Eine **Migrations- und Proliferations-Hemmung** von LEC ist in vivo im Kaninchenmodell möglich [58], [55]. Beschrieben sind zwei Verfahren der Inkubation der LEC mit zyklischem RGD- bzw. RGDS-Peptid: Bei dem ersten erfolgt die Inkubation mit RGD-Peptid durch ein osmotisches Pumpsystem, welches in eine subkutane Tasche implantiert wurde. Zyklisches RGDS-Peptid wurde über eine im Kapselsack platzierte Kanüle in einer konstanten Konzentration über die Hinterkapsel abgegeben. Bei einem zweiten Modell implantierte man nach der Kataraktextraktion zusätzlich zur IOL auch eine Polyaktinglykolsäure-Scheibe, aus welcher die verzögerte Freisetzung von RGD-Peptid erfolgte. Keine Angaben werden über die Anzahl der untersuchten Augen bzw. Tiere pro Gruppe gemacht. Weitere kritische Anmerkungen zu diesen Versuchen werden im Kapitel 5 „Diskussion“ näher ausgeführt.

Die genannten ermutigenden Ergebnisse bezüglich einer Nachstarhemmung mittels RGD-Peptiden lassen allerdings noch folgende Probleme und offene Fragen erkennen:

- a) Oft werden keine Angaben über die genaue *Art des verwendeten RGD-Peptids* gemacht. Es ist jedoch bekannt [72], daß zyklische Peptide eine größere inhibitorische Wirkung haben als Monomere. Unterschiedliche Molekulargewichte können diese Effekte ebenso beeinflussen. Auch werden sowohl GRGDS- als auch RGD-Peptide verwendet. Ein Vergleich der verschiedenen Studien ist somit nur eingeschränkt möglich, eine generelle Aussage über die Wirksamkeit „der RGD-Peptide“ in Bezug auf die Nachstarhemmung kann nicht getroffen werden.
- b) Die zur Wirkung einer verzögerten Freisetzung von RGD-Peptid durchgeführten Experimente [55], [58] gehen davon aus, daß eine *kurzzeitige Gabe des RGD-Peptids* nicht zu einem dauerhaften adhäsions- bzw. proliferationshemmenden Effekt führt. Untersucht wurde dies bisher jedoch nicht. Dies würde aber eine wesentlich einfachere klinische Handhabung bedeuten und wäre außerdem kostengünstiger. Vorstellbar ist, ein RGD-Peptid der Spüllösung für die Kataraktoperation zuzugeben. Eine orale bzw. systemische Applikation von RGD-Peptiden ist nicht möglich, da im Auge keine ausreichend hohen Wirkspiegel zu erwarten sind. Auch ist mit einer Interaktion der RGD-Peptide mit Blutbestandteilen, z.B. den  $\alpha_{IIb}\beta_{IIIa}$ -Integrinen der Thrombozyten [75], zu rechnen. Dadurch käme es zu einer Abnahme der Peptidkonzentration und zu Nebenwirkungen z.B. in Form einer Koagulopathie.
- c) Es liegen keine Ergebnisse über die Wirkung von RGD-Peptiden auf die *Langzeit-Proliferation humaner* Linsenepithelzellen in vitro vor (der längste untersuchte Zeitraum beträgt drei Stunden [57]).
- d) Auch die Wirkung der Peptide auf das *humane Hornhautendothel* in vitro und in vivo ist noch unbekannt bzw. nur anhand sehr kleiner Fallzahlen beschrieben.
- e) Ein eventuelles Rückgängigmachen der Adhäsion der LEC mit einem RGD-Peptid, also deren Lösung vom Boden der Kulturschale bzw. von der Kapsel, wurde bisher nicht untersucht. Es sind Untersuchungen zur Ablösung unterschiedlicher Zellarten von verschiedenen Bestandteilen extrazellulärer Matrix bzw. der Kulturschale mittels RGD-Peptiden durchgeführt worden, v.a. an Normal-Rat-Kidney-Zellen [76]. Gelänge eine Ablösung der LEC von der Linsen kapsel, könnten Zellen intraoperativ besser vom Kapselsack gelöst werden und so das Nachstarsubstrat vollständig entfernt werden.
- f) Um sicher zu sein, daß Nachstarhemmende Eigenschaften von RGD-Peptiden tat-

sächlich ausschließlich auf die RGD-Sequenz zurückzuführen sind, ist die Gegenüberstellung mit einem Kontrollpeptid zu fordern. Dieses müßte der Trägersubstanz der RGD-Peptide entsprechen und ein gleiches Molekulargewicht wie diese haben.

Aus den hier genannten Punkten leiteten wir die Zielstellung unserer Untersuchung ab (s. 2.).

### **1.6.3. RGD-Peptide in anderen medizinischen Bereichen**

Es sei erwähnt, daß auch in anderen Bereichen der Medizin RGD-Peptide bezüglich einer möglichen klinischen Anwendbarkeit untersucht werden. Zum Teil werden dort, im Gegensatz zur beabsichtigten adhäsionshemmenden Wirkung auf die Linsenepithelzelle, RGD-Peptide in gebundener Form zur Adhäsionsinduktion eingesetzt. Bei Gefäßprothesen [77] soll auf diese Weise eine verbesserte Endothelzell-Adhäsion auf diesen Implantaten erreicht werden und somit eine Senkung der Thrombogenität erfolgen. Durch eine verbesserte Epithelmigration möchte man insbesondere bei Verbrennungen II. Grades eine Beschleunigung der Wundheilung [78] herbeiführen. Auch in der Krebsterapie [79] wäre ein Einsatz von RGD-Peptiden denkbar, da RGD-bindende Rezeptoren Anteil an endogener und IL-2-stimulierter Aktivität der natürlichen Killer-Zellen haben. Bei der Thrombasthenie Glanzmann-Naegli [80] fehlt den Thrombozyten der Membranrezeptor für Fibrinogen ( $\alpha_{IIb}\beta_{IIIa}$ ), so daß keine Aggregation und damit Thrombenbildung möglich ist. Eine Adhäsionsinduktion mittels RGD-Peptiden wird untersucht. Ein adhäsionshemmender Effekt ist hingegen zur Thromboseprophylaxe [75] erwünscht, wo eine Hemmung der Thrombozytenaggregation über den GPIIb/IIIa-Rezeptor (entspricht dem Integrin  $\alpha_{IIb}\beta_{IIIa}$ ) angestrebt wird. Die Prophylaxe des akuten Nierenversagens [81] durch die Hemmung der Adhäsion toxischer Abbauprodukte an den Nierentubuli ist ein weiteres potentiellles Anwendungsgebiet der RGD-Peptide. Alle diese angesprochenen Einsatzmöglichkeiten von RGD-Peptiden befinden sich derzeit noch im experimentellen Stadium.

## **2. Ziel der experimentellen Arbeit**

10-50 % der Augen von Patienten, die sich einer Katarakt-Operation unterziehen, entwickeln innerhalb von ein bis fünf Jahren einen sogenannten Nachstar [6], [7]. Der Erfolg einer Katarakt-Operation wird durch die Entstehung dieses Nachstars oft wieder in Frage gestellt. Um den Visus der Patienten wieder auf das postoperativ erreichte Niveau zu heben, wird die Nachstarmembran heute überwiegend mittels Nd:YAG-Laser zentral eröffnet. Diese Behandlungsmethode birgt jedoch nicht unerhebliche Risiken und Kosten – ebenso wie die alternative Methode, die operative Nachstar-Absaugung. Es werden daher Möglichkeiten der Nachstar-*Prävention* gesucht.

Ausgangspunkt und Voraussetzung der Entstehung eines Nachstars ist die Adhäsion der Linsenepithelzellen an der Kapsel. Nach einer Kataraktoperation befinden sich gelöste, aber nicht vollständig entfernte Linsenepithelzellen (LEC) in der Vorderkammer. Gelingt es diesen, an der Kapsel zu adhären, kann sich durch Migration und Proliferation dieser Zellen eine Nachstarmembran bilden. Außerdem verbleiben auch bereits adhärenzte LEC auf der Linsenkapsel, die ebenso eine erneute Eintrübung hervorrufen können. Vorangehende Arbeiten [55], [56], [57], [58] haben gezeigt, daß RGD-Peptide in der Lage sind, Zelladhäsionen zu hemmen.

Ziel dieser Arbeit ist es nun, experimentell zu untersuchen, inwieweit die Hemmung der Zelladhäsion durch RGD-Peptide auch klinisch zur Prävention des Nachstars nach Katarakt-Operation einsetzbar ist.

Dies ist auf zwei Wegen denkbar: *Erstens* durch eine Hemmung der Adhäsion von Linsenepithelzellen, die intraoperativ durch Spülvorgänge zwar von der Kapsel gelöst, jedoch nicht vollständig entfernt werden konnten. Als ein sehr einfach klinisch umzusetzendes Verfahren ist der Zusatz von RGD-Peptid zur Spüllösung für die Kataraktoperation vorstellbar. Dann ist aber, bedingt durch den Kammerwasser-Turnover, mit recht kurzen Einwirkzeiten des Peptids auf die LEC zu rechnen. Daher wird untersucht werden, ob dennoch ausreichende Effekte zu erzielen sind (s. 1.6.2. b)). Insbesondere soll auch der Effekt einer Langzeit- bzw. Kurzzeitinkubation auf die Adhäsion und Proliferation humaner LEC beobachtet werden (s. 1.6.2. c)). *Zweitens* ist zu überprüfen, ob Linsenepithelzellen unter RGD-Peptid-Einwirkung besser oder gar vollständig von der Kapsel gelöst (s. 1.6.2. e)) und somit durch Spül-Saugvorgänge intraopera-

tiv entfernt werden können.

Schließlich soll die Verträglichkeit des von uns verwendeten zyklischen RGD-Peptids cRGD $\Delta$ FV für andere okuläre Strukturen, insbesondere das Hornhautendothel, untersucht werden (s. 1.6.2. d)).



### **3. Material und Methoden**

#### **3.1. Zellkultur von Linsenepithel-und Hornhautendothelzellen**

Wir erhielten *bovine* Bulbi des Schlachthofes Kasel-Golzig spätestens fünf Stunden nach Schlachtung der Tiere. Zunächst wurden sie unter fließendem Wasser abgespült und grob peribulbäre Anhangsgebilde entfernt. Anschließend erfolgte die Dekontamination der Bulbi durch Einlegen in PVD-Jodlösung für fünf Minuten, danach die Titration des Jods mittels Gabe der Bulbi in PBS-Natriumthiosulfat-Pufferlösung und zuletzt Spülung in PBS-Pufferlösung – wieder jeweils für fünf Minuten.

##### **3.1.1. Gewinnung von Hornhautendothelzellen**

Zunächst wurde mit dem Skalpell perilimbal die Sklera durchtrennt. Die so gewonnene Korneoskleralscheibe konnte dann vorsichtig in PBS-Pufferlösung gelegt werden. Ebenso wurden ca. zwölf Hornhautscheiben präpariert, die, da dieser Vorgang einige Zeit in Anspruch nahm, zwischenzeitlich in PBS-Pufferlösung auf Eis gesammelt wurden. Es konnte dann die Hornhaut, mit dem Endothel nach oben liegend, in eine Petrischale gelegt und die Endothelzellen mit einem Hockeymesser unter vorsichtigem Druck abradiert werden. Aufgrund eines besseren Proliferationsverhaltens wurden Zellen der zentralen Kornea bevorzugt. Auch konnte so eine Mischkultur mit anderen Zellen leichter vermieden werden. Die so gewonnenen Zellen wurden in 2 ml PBS-Pufferlösung gesammelt. Dann erfolgte die Zugabe einer Trypsin/EDTA-Lösung in einer Konzentration von 1 % für maximal sieben Minuten zur vollständigen Vereinzelung der Zellen. Nach Zugabe einer zehnfachen Menge Medium + 10 % Fetales Kälberserum (FCS) wurde diese Zell-Lösung für zehn Minuten bei 1.000 U/min und 15 °C zentrifugiert. Nach Verwerfung des Überstandes konnte das Pellet in 2 ml Kulturmedium + 10 % FCS resuspendiert und zu gleichen Teilen auf die sechs Wells der 6-Well-Kulturschale (Falcon, Becton & Dickinson Comp., New Jersey, U.S.A.) gegeben werden. Pro Well gab man 2 ml Medium zu. Unter dem Lichtmikroskop waren dann die noch schwimmenden Endothelzellen erkennbar.

##### **3.1.2. Gewinnung von Linsenepithelzellen**

Die Bulbi, die, nun ohne Korneoskleralscheibe, in PBS-Pufferlösung bis maximal 24

Stunden nach Präparationsbeginn noch im Kühlschrank aufbewahrt werden konnten, wurden innerhalb dieses Zeitraumes außerdem zur Gewinnung von Linsen verwendet. Dazu wurde der Bulbus zunächst in eine sterile Petrischale gelegt. Mit einer Pinzette konnte nun vorsichtig die Iris von der Linsenvorderfläche abgezogen werden. Die Linse ließ sich dann leicht zwischen den Branchen einer anatomischen Pinzette aus dem Bulbus herausdrücken. Pro Präparationssitzung konnten so wiederum ca. zwölf Linsen gewonnen werden, die dann in einer Petrischale noch sorgfältig von eventuell an der Linsenkapsel haftendem Irisgewebe gereinigt werden mußten. Die Linsenkapsel wurde mit Pinzetten von der Linsenrinde abgezogen und mit einer chirurgischen Pinzette in kleine Exzidate von ca. 3-4 mm Durchmesser geschnitten. Bevorzugt war hier die Übergangsregion zwischen Vorder- und Hinterkapsel mit den stoffwechselaktivsten und am stärksten proliferierenden Epithelzellen [1]. Diese Kapselexzidate wurden nun gleichmäßig auf die zwölf Wells einer 12-Well-Kulturschale verteilt und pro Well 2 ml DMEM + 10 % FCS zugegeben. Lichtmikroskopisch konnten einige Zellen auf den Kapselstücken gesehen werden.

### **3.1.3. Zellkultur**

Das für die Versorgung der Zellen verwendete komplette Kulturmedium setzte sich wie folgt zusammen:

- 100,0 ml DMEM (GIBCO BRL, Paisley, Schottland)
- 2,5 ml HEPES mit pH=7,2 (Serva, Feinbiochemica, Heidelberg)
- 1,0 ml L-Glutamin (GIBCO BRL, Paisley, Schottland)
- 0,1 ml Penicillin/Streptomycin (Sigma, St.Louis, U.S.A.)
- 0,1 ml Gentamycin (GIBCO BRL, Paisley, Schottland)
- 10,0 ml bzw. 5,0 ml FCS (GIBCO BRL, Paisley, Schottland)

Der Medienwechsel erfolgte nach jeweils drei Tagen. Die Linsenkapselexzidate wurden durch besonders sorgfältiges Pipettieren beim Medienwechsel in der ersten Woche in der Kulturschale belassen. War dann lichtmikroskopisch ein Herunterwachsen der Zellen von den Kapselstückchen auf den Boden der Kulturschale sichtbar, konnten diese entfernt werden. Die Konzentration des Serums im Kulturmedium wurde bei gutem Wachstum sowohl der Epithel- als auch der Endothelzellen von anfänglich 10 % auf 5 % reduziert. Die Zellen wuchsen bei einer Temperatur von 37,0 °C sowie bei 95 % O<sub>2</sub>

und 5 % CO<sub>2</sub> -Gehalt der Luft im Brutschrank.

Hatten die Zellen Konfluenz (geschlossener Zellrasen am Boden der Kulturschale) erreicht, erfolgte die erste Passagierung. Dies war sowohl bei bovinen Hornhautendothelzellen als auch bei bovinen Linsenepithelzellen nach zehn bis zwölf Tagen möglich.

Zur Passagierung der Zellen wurde jedes Well der Kulturschale mit 1 ml PBS und danach mit 1 ml PBS-EDTA (zur Lösung der Interzellularverbindungen) gespült. Anschließend erfolgte die Trypsinisierung (Ablösung der Zellen vom Boden der Kulturschale) mit 1 %iger Trypsin/EDTA-Lösung für maximal sieben Minuten. Wie auch bei der Gewinnung der Hornhautendothelzellen wurde das Trypsin wiederum mit der zehnfachen Menge DMEM + 10 % FCS neutralisiert und diese Zell-Lösung für zehn Minuten bei 1.000 U/min und 15 °C zentrifugiert.

Nach Verwerfen des Überstandes resuspendierte man das Zellkonzentrat in 1,0 ml DMEM + 10 % FCS. Linsenepithelzellen, die im oben beschriebenen Zeitraum ein sehr ausgeprägtes Wachstumsverhalten zeigten, wurden in 2,0 bzw. 3,0 ml DMEM + 10 % FCS resuspendiert (je nach mikroskopischem Eindruck von der ungefähren Menge der Zellen vor der ersten Passage).

Man ermittelte dann die vorhandene Zellzahl durch Auszählen in der Neubauer Zählkammer (Tiefe: 0,100 mm) (Gesellschaft für Laborbedarf mbH, Würzburg). Die so gewonnene erste Passage der Zellen konnte dann weiter für die Untersuchungen zur Adhäsionsinhibition bzw. der Ablösung von Zellen verwendet werden.

### **3.2. Gewinnung humaner Linsenepithelzellen und humaner intakter Hornhäute**

Für die Untersuchungen an *humanen* Linsenepithelzellkulturen und humanen exzidierten Hornhäuten wurden Bulbi von Hornhautspendern verwendet. Es handelte sich dabei um Bulbi, die bei einer erst *nach* der Bulbusentnahme bekannt gewordenen systemischen Infektionskrankheit des Spenders nicht mehr für eine Gewebegewinnung zur späteren Transplantation in Frage kamen. Weitere Gründe für die Nicht-Eignung zur Transplantation bestanden in einer zu niedrigen Endothelzellzahl (weniger als 2.000/mm<sup>2</sup>), in zentralen Hornhautnarben, die das funktionelle Ergebnis in Frage stellen, und in früheren intraokularen Eingriffen an diesen Augen. Diesbezügliche Informationen konnten in diesen Fällen erst nach Eukleation bzw. durch die Präparation der Augen gewonnen werden.

Das Präparationsverfahren humaner Bulbi entsprach dem der bovinen Bulbi, die verwendeten Substanzen zur Herstellung des kompletten Kulturmediums sind die oben aufgeführten (s. 3.1.3.).

Auf die unter 3.1.2. beschriebene Weise wurden humane Linsenepithelzellen gewonnen. Allerdings erfolgte hier die Zugabe von 1 ml DMEM + initial 20 % FCS, das dann im weiteren Verlauf auf 10 % FCS reduziert werden konnte. Die humanen Linsenepithelzellen zeigten ein insgesamt langsames Wachstumsverhalten bis zum Erreichen der Konfluenz (ca. vier bis sechs Wochen), weshalb die bei der Präparation gewonnenen Kapselexzidate in die Wells einer 24-Well-Kulturschale gegeben wurden. So erhielt man eine insgesamt größere Anzahl Zellen. Außerdem standen pro Präparationssitzung maximal zwei bis vier Bulbi zur Verfügung. Der Wechsel des Kulturmediums war nur zweimal wöchentlich erforderlich.

Humane Hornhäute wurden nach der unter 3.1.1. (das Endothel beließ man intakt) vorgestellten Methode gewonnen. Zwei Corneae standen zur Verfügung. Eine Hornhaut wurde direkt nach der Präparation mit cRGD $\alpha$ FV inkubiert, da die Spender-Serologie folgende Werte aufwies: HbsAg positiv, CMV positiv und TPHA reaktiv. Die andere Hornhaut war zunächst zur Transplantation vorgesehen und deshalb für fünf Wochen und zwei Tage im Brutschrank bei 37 °C und 95 % O<sub>2</sub> und 5 % CO<sub>2</sub> in Kulturmedium I aufbewahrt worden. Nach Ablauf der maximalen Lagerungsdauer (vier Wochen) wurde sie dann zur experimentellen Verwendung freigegeben und daraufhin in Kulturmedium II für 48 Stunden entquollen und, wie unter Kapitel 3.4.6. beschrieben, weiter verwendet.

Die Kulturmedien I und II enthalten auf 1.000 ml Medium:

- DMEM 13016-027 Life-Tech. 14,7 g
- NaHCO<sub>3</sub> 2,0 g
- FKS 20,0 ml
- Penicillin 100 i.E./ml
- Steptomycin 0,1 mg/ml
- Nystatin 50 i.E./ml
- Aqua ad inject.

In Kulturmedium II ist außerdem Dextran T 500 50,0 g enthalten.

Beide Medien sind steril gefiltert und auf einen pH-Wert von 7,45-7,55 gepuffert. Sie werden von der Apotheke der Charité Berlin, Campus Virchow-Klinikum, hergestellt.

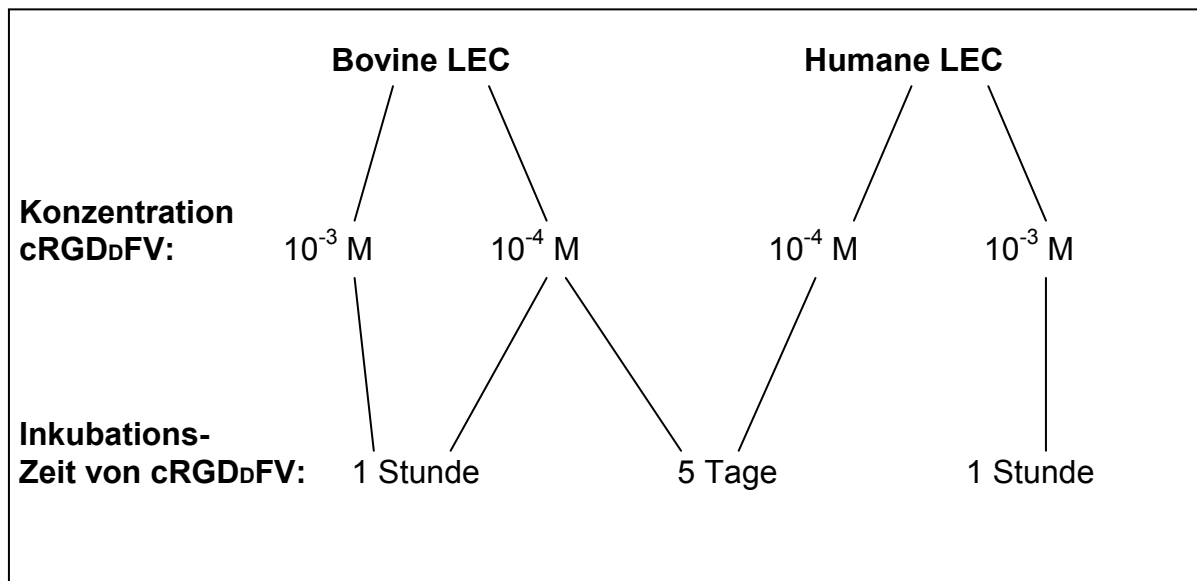
### **3.3. Untersuchungen zur Adhäsionsinhibition**

#### **3.3.1. Untersuchung der Adhäsionsinhibition auf dem Boden der Kulturschale**

Für die Untersuchungen zur Adhäsionsinhibition bzw. Lösung adhärenter Linsenepithel- bzw. Hornhautendothelzellen wurde das zyklische RGD-Peptid [Cyclo(-Arg-Gly-Asp-D-Phe-Val)] cRGD<sub>D</sub>FV mit einem Molekulargewicht von 574,6 g/mol (Fa. BACHEM Biochemica GmbH, Heidelberg; Deutschland; Produktnummer des Kataloges von 1998 und 1999: H-2574) verwendet. Dieses entspricht dem von Gurrath [72] und Noiri [81] untersuchten RGD-Peptid (s. 1.6.1.). Um auszuschließen, daß Unterschiede gegenüber der nicht mit cRGD<sub>D</sub>FV behandelten Gruppe nicht von der funktionellen Aminosäurenguppe (Arg-Gly-Asp), sondern der Trägersubstanz des Peptids hervorgerufen wird, benutzten wir außerdem ein Kontrollpeptid gleichen Aufbaus und Molekulargewichtes, das keine Arg-Gly-Asp-Gruppe aufwies (Fa. Merck KgaA, Darmstadt, Deutschland).

Das Adhäsionsverhalten boviner und humaner LEC wurde sowohl bei verschiedenen Konzentrationen von cRGD<sub>D</sub>FV als auch bei verschiedenen Inkubationszeiten desselben untersucht (s. Abb. 3.1.).

In jedem dieser Versuchsansätze wurden die Zellen der ersten Passage verwendet. 20.000 bovine LEC pro Well einer 12-Well-Kulturschale (ca. 5.263 Zellen/cm<sup>2</sup>) bzw. 9.500 humane LEC pro Well einer 24-Well-Kulturschale (ca. 5.278 Zellen/cm<sup>2</sup>) wurden in neun Wells pro auszuzählendem Zeitpunkt gegeben. In je drei Wells erfolgte die Zugabe von je 1,0 ml (für bovine LEC) bzw. 475 µl (für humane LEC) DMEM + 10 % FCS, in DMEM + 10 % FCS gelöstem Kontrollpeptid bzw. von in DMEM + 10 % FCS gelöstem cRGD<sub>D</sub>FV. cRGD<sub>D</sub>FV und Kontrollpeptid wurden im gleichen Versuch jeweils in der gleichen Konzentration verwendet.



**Abb. 3.1.:** Durchgeführte **Versuche zur Adhäsionsinhibition boviner und humaner LEC** auf Kulturschalen mittels cRGD<sub>β</sub>FV unterschiedlicher Konzentration und bei unterschiedlichen Inkubationszeiten.

Sollte nun die Wirkung einer *permanenten* Inkubation der LEC mit cRGD<sub>β</sub>FV auf deren Adhäsion untersucht werden, erfolgte die Auszählung der Zellen zu den in Abb. 3.1. genannten Zeitpunkten. Dazu wurde zunächst das Kulturmedium bzw. das in diesem gelöste Kontrollpeptid bzw. cRGD<sub>β</sub>FV komplett wieder entfernt. Die Wells der Kulturschale wurden mit 1 ml PBS-Pufferlösung und danach mit 1 ml PBS-EDTA-Pufferlösung gespült. Dadurch sollten alle nicht-adhärenenten Zellen entfernt werden. Die nun noch am Boden der Kulturschale adhärenenten Zellen wurden für maximal sieben Minuten mit 300 µl 1 % Trypsin/EDTA-Lösung inkubiert, die dann mit der zehnfachen Menge DMEM + 10 % FCS neutralisiert wurde. Mit dieser Lösung konnte der Boden der Wells noch einmal unter dem Strahl der Pipette gründlich gespült werden. Die so gewonnen Zellsuspensionen wurden in Zentrifugenröhrchen (ein Röhrchen pro Well) gegeben und zum Zentrifugieren mit 3 ml DMEM auf ca. 6 ml aufgefüllt. Nach der Zentrifugation für zehn Minuten bei 1.000 U/min und 15 °C verwarf man den Überstand. Die zur Resuspension des Zellpellets nötige Menge an DMEM +10 % FCS variierte je nach Art des Experimentes, Zeitpunkt innerhalb des Versuches und Gruppe.

Die Auszählung der zum gegebenen Zeitpunkt adhärenenten Zellen erfolgte wiederum in der Neubauer Zählkammer. Dabei wurde die Zellzahl pro Well und Auswertungszeitpunkt durch Bildung des Mittelwertes der vier ausgezählten Kammern bestimmt. Das Experiment wurde zweimal durchgeführt. Anschließend konnte der Median einer Grup-

pe aus den Mittelwerten aller ermittelten Zellzahlen der verschiedenen Zeitpunkte aus den zwei gleichartigen Experimenten gebildet werden.

Die optimalen Zeitpunkte zum Auszählen der LEC waren in Vorversuchen gefunden worden. Dabei hatte man 20.000 bovine Zellen pro Well in 12-Well-Kulturschalen gegeben – unter Anwesenheit von 1,0 ml DMEM + 10 % FCS. Es wurde sowohl der Verlauf am ersten Tag als auch die Zahl adhärenter Zellen an jedem der folgenden sechs Tage bestimmt. Dabei zeigte sich, daß die Zellen ohne einen Medienwechsel nur für fünf Tage vital gehalten werden können. Deshalb wurde das Adhäsionsverhalten bei permanenter Inkubation mit cRGD $\alpha$ FV lediglich über einen Zeitraum von fünf Tagen untersucht. Da bei der nur einstündigen Inkubation mit cRGD $\alpha$ FV dieses nach der ersten Stunde bereits wieder entfernt wird, ist ein Medienwechsel in diesem Versuchsansatz möglich, die Versuchsdauer betrug in diesem Fall daher sieben Tage. Der Medienwechsel erfolgte am dritten Tag des Experimentes.

War geplant, die Zellen lediglich für eine Stunde mit cRGD $\alpha$ FV (resp. Kontrollpeptid bzw. Kontrollmedium) zu inkubieren, wurden die Lösungen nach dieser Zeit abpipettiert und die Wells anschließend mit 1 ml PBS-Pufferlösung gespült. Sowohl die abgenommene Lösung als auch die PBS-Spüllösung wurden in Zentrifugenröhrchen (wieder ein Röhrchen je Well) gegeben, mit 4 ml DMEM aufgefüllt und bei 1.000 U/min und 15 °C für zehn Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde sodann wieder verworfen und das Pellet in 100  $\mu$ l DMEM + 10 % FCS resuspendiert und wieder dem entsprechenden Well zugegeben. Auf diese Weise sollte verhindert werden, daß zu diesem Zeitpunkt noch nicht adhärenente Zellen durch das Entfernen der Medien verloren gehen. Sofort nach Entnahme der Medien waren jedem Well 900  $\mu$ l DMEM + 10 % FCS zugefügt worden; die Kulturschalen wurden für die Zeit der Zentrifugation erneut in den Brutschrank gestellt.

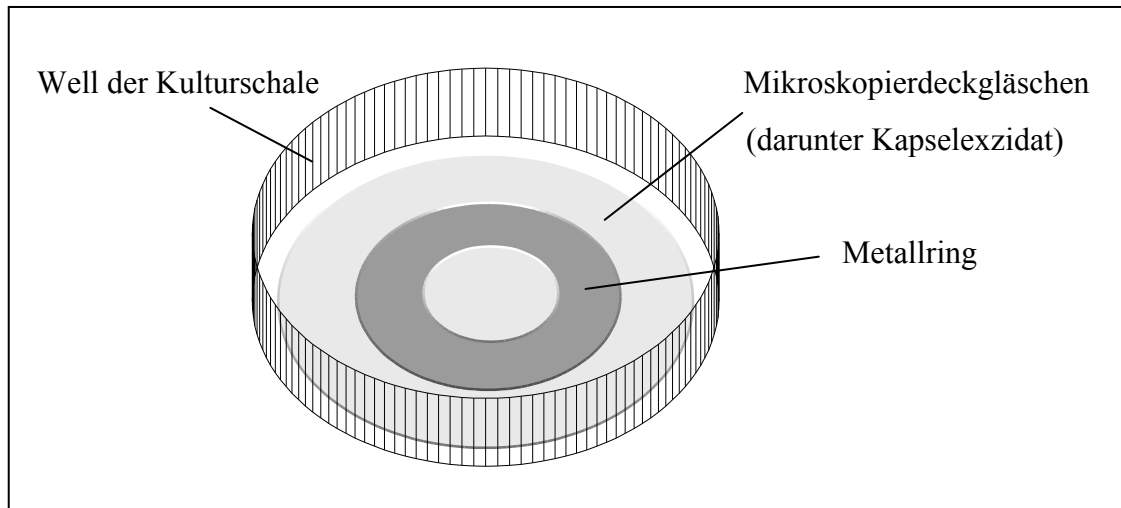
### ***3.3.2. Untersuchung der Adhäsionsinhibition auf exzidierten bovinen Vorderkapseln***

Die, wie unter 3.1.2., 3.1.3. und 3.2. beschrieben, gewonnene erste Passage humaner und boviner LEC wurde auf bovine Vorderkapselexzidate gesät.

Diese Vorderkapselexzidate konnten folgendermaßen hergestellt werden: Bovine Linsenkapseln wurden mit einer chirurgischen Pinzette in der Mitte der Hinterkapsel beginnend bis zum Äquator aufgerissen. So ließ sich die noch intakte Vorderkapsel sehr gut auf dem Boden einer Petrischale ausbreiten. Mit einem Trepan eines Durchmes-

sers von 5,0 mm konnten nun drei bis vier kreisrunde Exzidate pro Kapsel ausgestanzt werden. Diese wurden dann zur Ablösung noch adhärenter Zellen für zehn Minuten in 10%ige Trypsin/EDTA-Lösung gelegt. Danach erfolgte noch eine möglichst schonende Politur beider Kapselseiten mit einem Hockeymesser. Je ein Exzidat wurde in je einem Well einer 24-Well-Kulturschale ausgebreitet und runde Mikroskopier-Deckgläschen mit einem Durchmesser von 12 mm darübergerlegt. Um eine möglichst gute flächige Adhäsion der Vorderkapseln zu erreichen, erfolgte noch ein Beschweren mittels eines sterilisierten handelsüblichen Fitschen-Ringes (Versuchsaufbau s. Abb. 3.2.). Erst dann gab man 1 ml DMEM + 1 % FCS pro Well zu. Nach etwa zehn Tagen konnten sowohl die beschwerenden Metall-Ringe als auch die Deckgläschen entfernt werden. Ein vorsichtiger Medienwechsel wurde vorgenommen. Es war dann ein Großteil der Vorderkapselscheiben adhärent und konnte nun für weitere Untersuchungen gebraucht werden. In je drei Wells mit Kapsel wurden je 475 µl DMEM + 10 % FCS bzw. darin gelöstes cRGD<sub>D</sub>FV bzw. Kontrollpeptid der Konzentration 10<sup>-3</sup> M und 9.500 humane LEC gegeben. Die Inkubationszeit betrug fünf Tage. Lichtmikroskopisch (Phasenkontrastmikroskop Leica, DM IRB) wurde nun nach einer Stunde und nach drei, vier, fünf und sieben Tagen das Adhäsionsverhalten auf Kapseln in den verschiedenen Gruppen beobachtet und fotodokumentiert. Das Experiment wurde zweimal durchgeführt. Es erfolgte keine Auszählung der auf den Kapseln adhärenenten Zellen, da sich zeigte, daß alle eingegebenen Zellen in der cRGD<sub>D</sub>FV-Gruppe ausschließlich auf der Kapsel hafteten, während sich in der Kontrollpeptid- und der Kontroll-Gruppe die Zellen gleichmäßig auf Kapsel und Boden des Wells verteilten. Somit erschien ein Vergleich des Adhäsionsverhaltens zwischen der cRGD<sub>D</sub>FV-Gruppe und der Kontrollpeptid-Gruppe anhand der Anzahl der auf der Kapsel adhärenenten Zellen nicht sinnvoll.





**Abb. 3.2.: Versuchsaufbau** zur Erlangung von Adhärenz exzidierter boviner **Linsen-Vorderkapseln** am Boden der Kulturschale

### 3.4. Untersuchung zur Lösung adhärenter Linsenepithelzellen und Hornhautendothelzellen

#### 3.4.1. Lösung adhärenter boviner LEC vom Boden der Kulturschale

Die erste Passage boviner bzw. humaner LEC war, wie unter 3.1., 3.1.2. und 3.2. beschrieben, gewonnen worden. 20.000 Zellen/Well einer 12-Well-Kulturschale (bovine LEC) bzw. 9.500 Zellen/Well einer 24-Well-Kulturschale (humane LEC) wurden in die Kulturschalen gegeben – je neun Wells boviner bzw. humaner LEC. Hatten die Zellen nach einigen Tagen bzw. Wochen Konfluenz erreicht, erfolgte die Zugabe von je 1,0 ml Kulturmedium + 10 % FCS (für die Kontrollgruppe), Kontrollpeptid  $10^{-4}$  M in Kulturmedium + 10 % FCS (Kontrollpeptid-Gruppe) und cRGD<sub>D</sub>FV  $10^{-4}$  M in Kulturmedium + 10 % FCS (cRGD<sub>D</sub>FV-Gruppe) – je Gruppe drei Wells. Das Verhalten der Zellrasen wurde lichtmikroskopisch im fünf- bis zehnminütigen Abstand beobachtet. In der Zwischenzeit stellte man die Kulturschalen wieder in den Brutschrank (37 °C, 95 % O<sub>2</sub> und 5 % CO<sub>2</sub>). Parallel dazu wurden je neun (drei mal drei) Wells untersucht, in die nach Erreichen der Konfluenz eine zentrale Wunde gesetzt worden war. Hierzu war zuvor mittels eines zur Hornhauttransplantation verwendeten sterilen Trepanns mit dem Durchmesser 5,0 mm ein ca. 1,5 cm langes Stück eines handelsüblichen elastischen Radiergummis ausgestanzt worden. Dieses Stück legte man für einige Stunden in 70%igen Alkohol ein. Etwa 15 Minuten vor dem Setzen der Wundläsion wurde der Radiergummi dann unter der

sterilen Arbeitsbank luftgetrocknet und anschließend in den Trepan eingeführt. Dabei sollte etwa 1 mm des Radiergummis über den Trepanationsrand des Trepans hinausreichen (s. Abb. 3.3.).



**Abb. 3.3.:** Modifizierter **Trepan** zum Setzen einer definierten Läsion in den Zellrasen (Photographie mit Erlaubnis übernommen aus: Ryseck, I. Dissertationsskript Berlin 2000)

Der so modifizierte Trepan wurde dann gerade und unter möglichst gleichmäßiger Belastung auf den (noch mit DMEM + 10 % FCS bedeckten) Zellrasen gesetzt. Dies geschah so kräftig, daß eine Gravur der Trepanränder im Boden der Kulturschale entstand. Durch das Radiergummi im Inneren des Trepans sollten die Zellen, die sich innerhalb der Läsion befanden, abradiert werden. Nach vorsichtigem Herausnehmen des Trepans spülte man einmal sehr behutsam über den Zellrasen mit der Läsion. Dazu wurde zunächst das Kulturmedium abpipettiert und dann mit PBS-Pufferlösung gespült. So sollte noch in der Läsion verbliebener Zelldebris entfernt werden. Im Anschluß daran erfolgte, wie oben beschrieben, die Zugabe von 1,0 ml reinem Medium, in Medium gelöstem Kontrollpeptid bzw. cRGD $\alpha$ FV in je drei Wells. Auch hier wurde das weitere Verhalten der konfluenten Zell-Layer mit Läsion, wie eingangs aufgeführt, lichtmikroskopisch (Lichtmikroskop Sedival, Fa. Carl Zeiss Jena) beobachtet.

Das Experiment wurde (mit und ohne Wunde) zweimal durchgeführt.

#### **3.4.2. Lösung adhärenter LEC von exzidierten bovinen Vorderkapseln**

Zunächst wurden bovine Linsen-Vorderkapseln, wie unter 3.3.2. geschildert, präpariert. Zur Untersuchung der Lösung adhärenter LEC von exzidierten bovinen Vorderkapseln gab man zunächst je 10.000 humane LEC der ersten Passage auf die Kapseln. Waren die Zellen auf der Kapsel konfluent, erfolgte die Zugabe von je 1,0 ml DMEM + 10 % FCS bzw. darin gelöstem cRGD $\alpha$ FV bzw. Kontrollpeptid der Konzentration  $10^{-4}$  M und

$10^{-3}$  M (je Gruppe drei Kapseln). Man beobachtete dann in der ersten Stunde in zehn- bis fünfzehnminütigen Abständen und später im Stundenabstand lichtmikroskopisch (Phasenkontrastmikroskop Leica, DM IRB) das Verhalten der konfluenten Zell-Layer, sowohl auf der Kapsel als auch am umgebenden Boden der Kulturschale. Dieses Experiment wurde einmal wiederholt.

### **3.4.3. Lösung adhärenter humaner LEC von humanen Vorderkapseln**

Intraoperativ, während der Kataraktoperation, wurde durch den Operateur eine vordere Kapsulorrhexis durchgeführt. Die so erhaltenen etwa kreisrunden Vorderkapselexzidate gab man sogleich in bereits vorbereitete Eppendorfgefäße (1,0 ml). Diese enthielten je 1,0 ml DMEM + 10 % FCS bzw. darin gelöstes cRGD<sub>D</sub>FV bzw. Kontrollpeptid in den Konzentrationen von  $10^{-4}$  M (zwölf Präparate der cRGD<sub>D</sub>FV-Gruppe und 17 Präparate der Kontrollgruppe) und  $2,5 \times 10^{-3}$  M (je acht Präparate der cRGD<sub>D</sub>FV-Gruppe und der Kontrollgruppe). Als „Kontrollgruppe“ werden sowohl in Kontrollmedium (Kulturmedium mit 10 % FCS) als auch in Kontrollpeptid inkubierte Vorderkapseln bezeichnet. Die Eppendorfgefäße wurden wieder verschlossen und im Brutschrank bei 37 °C und 95 % O<sub>2</sub> und 5 % CO<sub>2</sub> für 24 ( $10^{-4}$  M) bzw. 48 Stunden ( $2,5 \times 10^{-3}$  M) inkubiert. Sodann entnahm man die Kapseln vorsichtig und breitete sie auf je einem Objektträger aus, trocknete sie an der Luft, und anschließend wurden sie zur Hitzefixation kurz durch die Flamme des Bunsenbrenners gezogen. Zum Schluß erfolgte die Färbung der Kerne und des Protoplasmas der so gewonnenen Präparate mit Giemsa-Farblösung (Dr. K. Hollborn & Söhne, Leipzig): Ein Tropfen Giemsa wurde für ca. 30 Sekunden auf die Kapsel auf dem Objektträger gegeben, dann kurz mit Leitungswasser abgespült und wiederum an der Luft getrocknet.

Die Präparate wurden ohne Kenntnis der drei Untersucher darüber, ob es sich um die Kontrollgruppe, die Kontrollpeptid-Gruppe oder die cRGD<sub>D</sub>FV-Gruppe handelte, unter dem Lichtmikroskop (Olympus BH-2) bei hundertfacher Vergrößerung untersucht. Die Zuordnungen der Präparate zu einer der zwei Gruppen (cRGD<sub>D</sub>FV- bzw. Kontroll-Gruppe) durch die drei Untersucher wurde in 2x2-Felder-Tafeln festgehalten. Es sollte geprüft werden, ob die Erwartungen der Untersucher an die jeweilige Gruppe (cRGD<sub>D</sub>FV-Gruppe: wenige, avitale Zellen auf der Kapsel; Kontroll- und Kontrollpeptid-Gruppe: viele, vitale Zellen auf der Kapsel) erfüllt wurden. Die Photodokumentation erfolgte mittels des Durchlichtmikroskops Axiophot (Fa. Carl Zeiss Jena) bei fünfzig- und hundertfacher Vergrößerung.

#### **3.4.4. Spender-Intraokularlinse im Kapselsack**

Von einem Hornhautspender konnten die im Kapselsack befindlichen Intraokularlinsen (IOL) beider Augen gewonnen werden (Präparation des Bulbus wie unter 3.1. beschrieben). Wie lang die Kataraktoperationen der beiden Augen zurücklagen, war nicht bekannt. Es zeigte sich beidseits eine deutlich ausgeprägte Soemmerring-Ringkatarakt und Kapselfibrose.

Der Kapselsack des rechten Auges wurde in mit 1,0 ml 10 %igem Medium gelöstem Kontrollpeptid ( $10^{-4}$  M), die des linken Auges mit 1,0 ml in Medium gelöstem cRGD $\Delta$ FV ( $10^{-4}$  M) inkubiert, jeweils in einem Well einer 12-Well-Kulturschale. Die Einwirkzeit betrug 96 Stunden bei einer Temperatur von 37 °C und unter 95 % O<sub>2</sub> und 5 % CO<sub>2</sub>.

Am vierten Tag wurden die Kapseln unter dem Operationsmikroskop für zehn Minuten mit der jeweiligen Inkubationslösung unter dem Druck der Spritze mit Hilfe einer kleinen Kanüle gespült und der noch vorhandene Nachstar im Vergleich zum Zeitpunkt des Beginns des Experimentes lichtmikroskopisch (Phasenkontrastmikroskop Leica, DM IRB) bei fünfzig- und hundertfacher Vergrößerung beurteilt.

#### **3.4.5. Einfluß von cRGD $\Delta$ FV auf konfluente Hornhautendothelzell-Layer**

Die erste Passage boviner Hornhautendothelzellen wurde in Wells einer 12-Well-Kulturschale (20.000 Zellen/Well) unter Anwesenheit von je 1,0 ml DMEM + 10 % FCS/Well ausgesät. Waren diese nach einigen Tagen konfluent, wurden die Medien entnommen und in je drei Wells 1,0 ml DMEM + 10 % FCS/Well bzw. darin gelöstes cRGD $\Delta$ FV bzw. Kontrollpeptid (jeweils  $10^{-4}$  M) zugegeben. In zehnminütigen Abständen erfolgte die lichtmikroskopische Untersuchung über einen Gesamtzeitraum von 4,75 Stunden. Zwischen den Beobachtungszeitpunkten wurde die Kulturschale wieder in den Brutschrank gestellt (37,0 °C, 5% CO<sub>2</sub>, 95 % O<sub>2</sub>). Nach Ablauf der Untersuchung konnten die Zellen fixiert und gefärbt werden: Zunächst entfernte man die Medien aller Wells und spülte die Wells mit 1 ml PBS-Pufferlösung möglichst schonend. Danach gab man soviel Methanol in jedes Well, daß der Boden gerade bedeckt war. Nach zehnminütiger Einwirkung wurde das Methanol wieder entfernt und mittels PBS gespült und nun für weitere zehn Minuten ein Tropfen Giemsa auf den Boden der Kulturschale gegeben. Nach anschließender Spülung mit Aqua dest. konnten die Wells über einem Papierhandtuch trocken geklopft werden, so daß eine längere Aufbewahrung ermöglicht wurde. Die Endothelzellen waren nun unter dem Lichtmikroskop (Sedival, Carl Zeiss Jena) bei hundertfacher Vergrößerung zu beurteilen.

#### **3.4.6. Einfluß von cRGD<sub>D</sub>FV auf humane Hornhäute in vitro**

Zwei humane Spenderhornhäute konnten gewonnen werden (s. 3.2.). Beide Hornhäute wurden nach Entnahme aus oben genannten Aufbewahrungsmedien zunächst in Petrischalen gelegt und für eine Minute in steriler physiologischer Kochsalzlösung gespült. Danach erfolgte in einer trockenen Petrischale, in der die Hornhäute mit der Endothelseite nach oben lagen, die Gabe eines Tropfens 5 %iger Trypan-Blau-Farbsubstratlösung (Sigma, St.Louis, U.S.A) auf das Endothel für maximal 60 Sekunden. Erneut wurde dann die Hornhaut in physiologischer Kochsalzlösung geschwenkt, um nicht gebundene Farbreste zu entfernen. Es resultierte die Anfärbung von avitalen Endothelzellen. Auch sammelte sich die Farbe in Falten der Hornhaut. In einer ebenso mit physiologischer Kochsalzlösung gefüllten Petrischale konnten nun die Hornhäute, sowohl endothelseitig als auch epithelseitig, unter dem Phasenkontrastmikroskop (Leica, DM IRB) bei fünfzig- bzw. hundertfacher Vergrößerung beurteilt werden. Hierbei wurde besonderes Augenmerk auf mit Trypan-Blau gefärbte Bezirke des Endothels und die Zellmorphologie des Endo- und Epithels gerichtet. Dieser Status vor der Inkubation mit cRGD<sub>D</sub>FV wurde fotodokumentiert, in den oben genannten Vergrößerungen.

Nun wurden die zwei Hornhäute in je ein Well einer 12-Well-Kulturschale, gefüllt mit 1,5 ml cRGD<sub>D</sub>FV  $2 \times 10^{-3}$  M, eingelegt, wiederum die Endothelseite der Hornhäute nach oben gerichtet. Nach 24 und 48 Stunden entnahm man die Hornhäute, nach dem oben beschriebenen Verfahren wurden sie gespült. Nach Anfärbung mit Trypan-Blau erfolgte wiederum die Beurteilung und Fotodokumentation von Epithel und Endothel unter Verwendung obiger Vergrößerungen. Nach 48 Stunden wurde die Untersuchung beendet. Ein Vergleich zwischen dem jeweiligen Anfangsstatus und dem Zustand nach 24 bzw. 48 Stunden konnte anhand der Fotodokumentation deskriptiv vorgenommen werden.

### **3.5. Statistische Auswertung**

#### **3.5.1. Untersuchungen der Adhäsionsinhibition boviner und humaner LEC auf dem Boden der Kulturschale**

Es wurden zunächst für alle Untersuchungszeitpunkte zweier gleichartiger (in Bezug auf Konzentration und Inkubationszeit von cRGD<sub>D</sub>FV und Kontrollpeptid) Experimente die

Mediane der Anzahl adhärenter Zellen ermittelt. Alle drei Gruppen (cRGD $\alpha$ FV-, Kontrollpeptid- und Kontroll-Gruppe) wurden sodann mittels des ANOVA Rangsummen-Testes nach Friedman verglichen. Als statistisch signifikant wertete man p-Werte  $<0,001$ . Zum paarweise multiplen Vergleich der Gruppen wurde die Korrektur nach Dunn verwendet, statistisch signifikant waren p-Werte  $<0,05$ .

Als Maß für die Streuung wurden die oberen und unteren Quartile der Mediane der jeweiligen Untersuchungszeitpunkte (s. Abbildungen des Kapitels 4) benannt.

### **3.5.2. Lösung adhärenter humaner LEC von humanen Vorderkapseln**

Zur Auswertung der 2x2-Felder-Tafeln (falsch positive, falsch negative und richtige Zuordnungen der Untersucher zu den beiden Gruppen) wurde Fischers Exakter Test angewendet. P-Werte  $<0,05$  wurden als statistisch signifikant angesehen.

## 4. Ergebnisse

### 4.1. Untersuchungen zum Adhäsionsverhalten *boviner* Linsenepithelzellen unter cRGD<sub>D</sub>FV auf dem Boden der Kulturschale

Das Adhäsionsverhalten boviner LEC wurde nach **zwei verschiedenen Einwirkzeiten von cRGD<sub>D</sub>FV** verglichen:

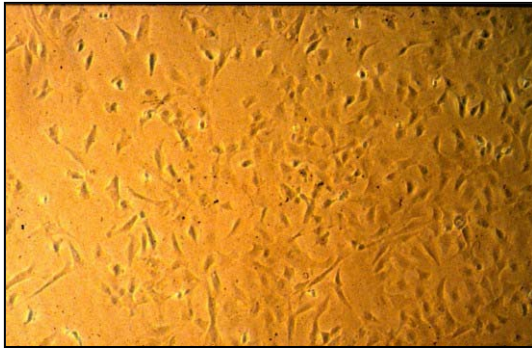
- a) unter permanenter Anwesenheit des cRGD<sub>D</sub>FV über einen Zeitraum von 5 Tagen und
- b) nach nur einstündiger cRGD<sub>D</sub>FV-Einwirkung.

Wurde das cRGD<sub>D</sub>FV in einer Konzentration von  $10^{-4}$  M über **5 Tage** auf den LEC belassen, so betrug die Adhäsionshemmung der ausgesäten Zellen nach 5 Tagen 100 % (keine adhärenen Zellen in der cRGD<sub>D</sub>FV-Gruppe gegenüber 162.500 adhärenen Zellen in der Kontrollpeptid-Gruppe) (s. Abb. 4.1. a) und b), Abb. 4.2. und Tab. 4.1.). Dabei berechnet sich die *Adhäsionshemmung* zu einem bestimmten Zeitpunkt wie folgt: Der Median der Anzahl adhärenter Zellen der Kontrollpeptid-Gruppe des ausgewählten Zeitpunktes wird 100 % gesetzt. Die im Vergleich dazu x % Adhäsion der cRGD<sub>D</sub>FV-Gruppe zum gleichen Zeitpunkt wird von 100 % abgezogen.

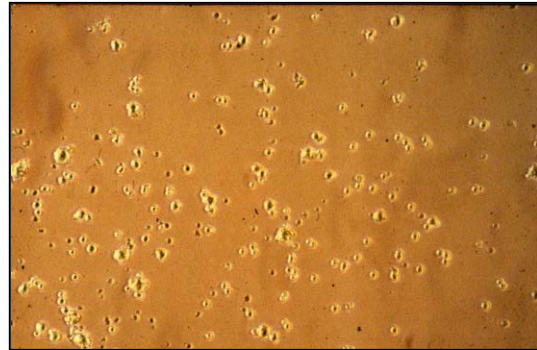
Die Unterschiede zwischen den Medianen der Anzahl adhärenter Zellen waren statistisch signifikant ( $p < 0,0001$ ). Im paarweise multiplen Vergleich mittels Dunns Methode lag ein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den Medianen der Anzahl adhärenter Zellen der Kontroll- und cRGD<sub>D</sub>FV-Gruppe bzw. der Kontrollpeptid- und cRGD<sub>D</sub>FV-Gruppe vor ( $p < 0,05$ ), nicht jedoch zwischen Kontroll- und Kontrollpeptid-Gruppe ( $p > 0,05$ ).

Zeit [h]	Kontrolle	Kontr.peptid	cRGD <sub>D</sub> FV $10^{-4}$
1	2375	2500	250
48	8500	6750	0
72	29000	30000	0
120	160000	162500	0

**Tab. 4.1.:** 5-Tages-Adhäsionsexperiment boviner LEC mit permanenter Einwirkung von cRGD<sub>D</sub>FV  $10^{-4}$  M: Mediane der Anzahl adhärenter Zellen.

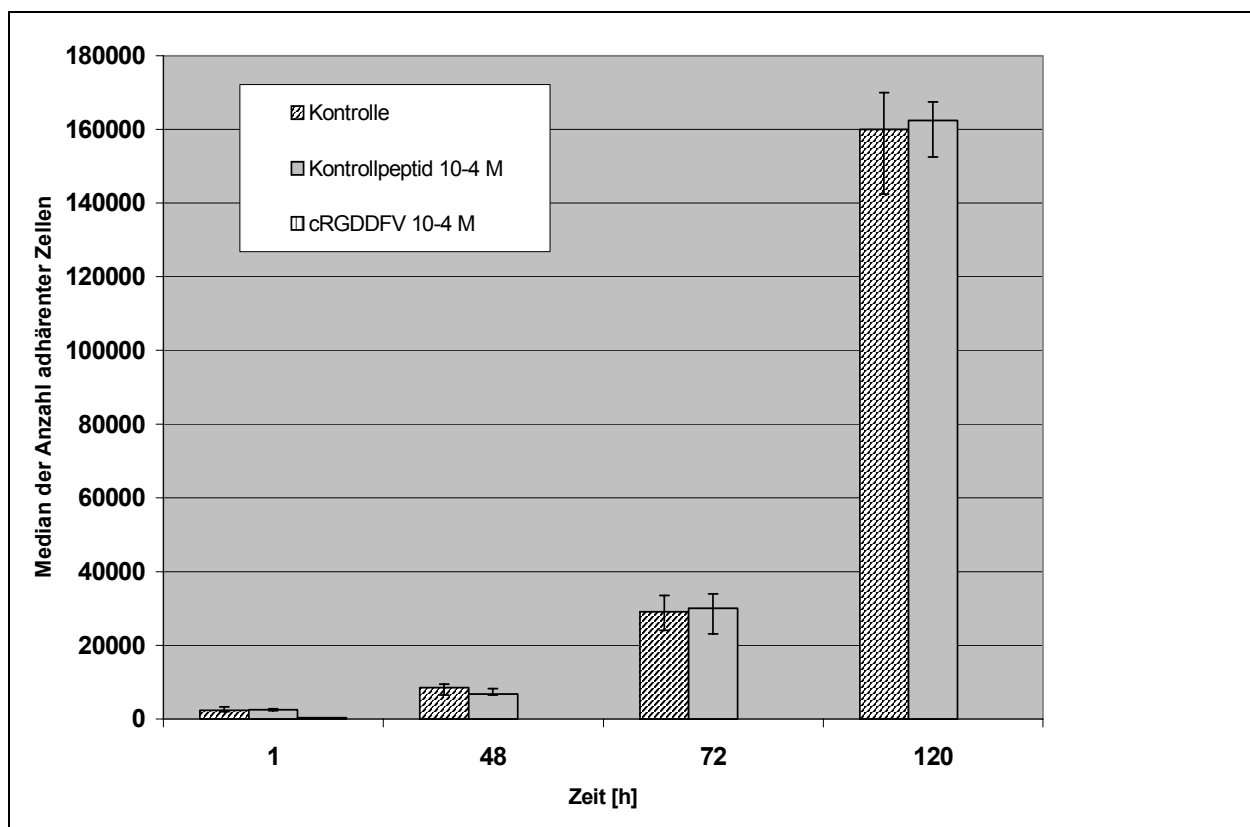


**Abb. 4.1. a)**



**Abb. 4.1. b)**

**Abb. 4.1. a) und b):** 5-Tages-Adhäsionsexperiment boviner LEC mit permanenter Einwirkung von cRGDDFV  $10^{-4}$  M: **a)** Kontrollpeptid-Gruppe und **b)** cRGDDFV 48 Stunden nach Beginn des Experimentes. In **Abb 4.1. b)** sind ausschließlich runde, nicht-adhärenente Zellen sichtbar. (jeweils hundertfache Vergrößerung)



**Abb. 4.2.:** 5-Tages-Adhäsionsexperiment boviner LEC mit permanenter Einwirkung von cRGDDFV  $10^{-4}$  M: Mediane der Anzahl adhärenter Zellen.

Als Parameter für die Streuung der Werte werden die oberen und unteren Quartile der Mediane angezeigt. (Adhäsion auf dem Boden eines 12-Well-dish; n=6)



Wurden aber die bovinen LEC für nur **eine Stunde** mit dem zyklischen RGD-Peptid cRGD<sub>D</sub>FV in einer Konzentration von  $10^{-4}$  M inkubiert, kam es im Verlauf einer Woche zu einem stetigen Abfall der Adhäsionshemmung (s. Tab. 4.2. a) und Abb. 4.4. a)): Nach 48 Stunden betrug diese noch 90,3 %, nach 7 Tagen nur noch 48,5 %. Trotz dieser immer noch recht hohen Adhäsionsinhibition waren die Zellen in der cRGD<sub>D</sub>FV-Gruppe bereits nach fünf Tagen konfluent.

Deshalb wurde untersucht, ob mit einer Peptidkonzentration von  $10^{-3}$  M bei gleicher Einwirkzeit (1 Stunde) eine effektivere Hemmung der Adhäsion der LEC möglich sei. Wie aus Tab. 4.2 b) hervorgeht, nahm die Adhäsionshemmung darunter nicht zu (41,9 % am 7.Tag); auch hier waren die Zellen bereits konfluent (s. Abb. 4.3. a) und b) und Abb. 4.4. b)).

Ein mikroskopisch sichtbarer Unterschied zwischen Kontrollpeptid- und cRGD<sub>D</sub>FV-Gruppe lag am siebten Tag des Experimentes nicht vor.

Zwischen den Medianen der Anzahl adhärenter Zellen bestand ein statistisch signifikanter Unterschied ( $p < 0,0001$  bzw.  $p < 0,0001$  für cRGD<sub>D</sub>FV und Kontrollpeptid der Konzentration  $10^{-4}$  M bzw.  $10^{-3}$  M). Zwischen Kontrollgruppe und Kontrollpeptid-Gruppe lag bei einer Konzentration von  $10^{-4}$  M kein statistisch signifikanter Unterschied vor ( $p > 0,05$ ), jedoch bei einer Konzentration von  $10^{-3}$  M ( $p < 0,05$ ).

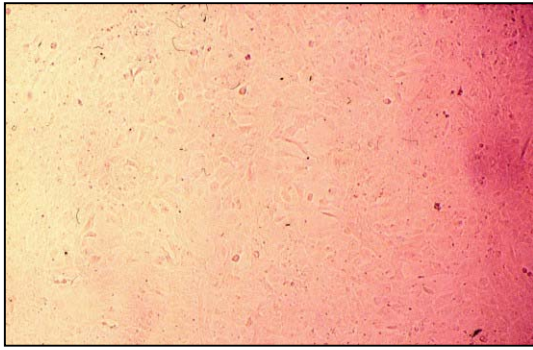
Zeit [h]	Kontrolle	Kontr.peptid	cRGD <sub>D</sub> FV $10^{-4}$
1	2500	2000	125
48	11500	10000	1750
72	30500	29750	6500
120	217500	227500	73750
168	348750	335000	172500

**Tab. 4.2. a)**

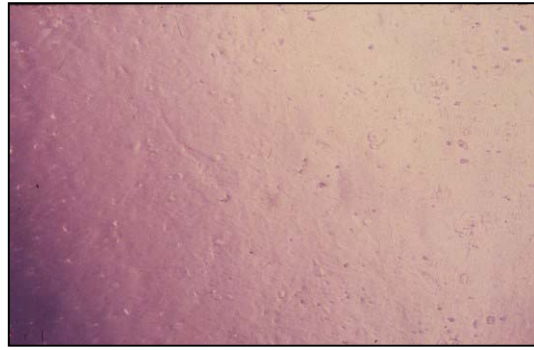
Zeit [h]	Kontrolle	Kontr.peptid	cRGD <sub>D</sub> FV $10^{-3}$
1	1250	1250	125
48	9875	10250	875
72	62500	39875	2000
120	318750	316250	50000
168	392500	337500	196250

**Tab. 4.2. b)**

**Tab. 4.2. a) und b):** 7-Tages-Adhäsionsexperiment boviner LEC mit 1-stündiger Einwirkung von cRGD<sub>D</sub>FV a)  $10^{-4}$  M und b)  $10^{-3}$  M: Mediane der Anzahl adhärenter Zellen.

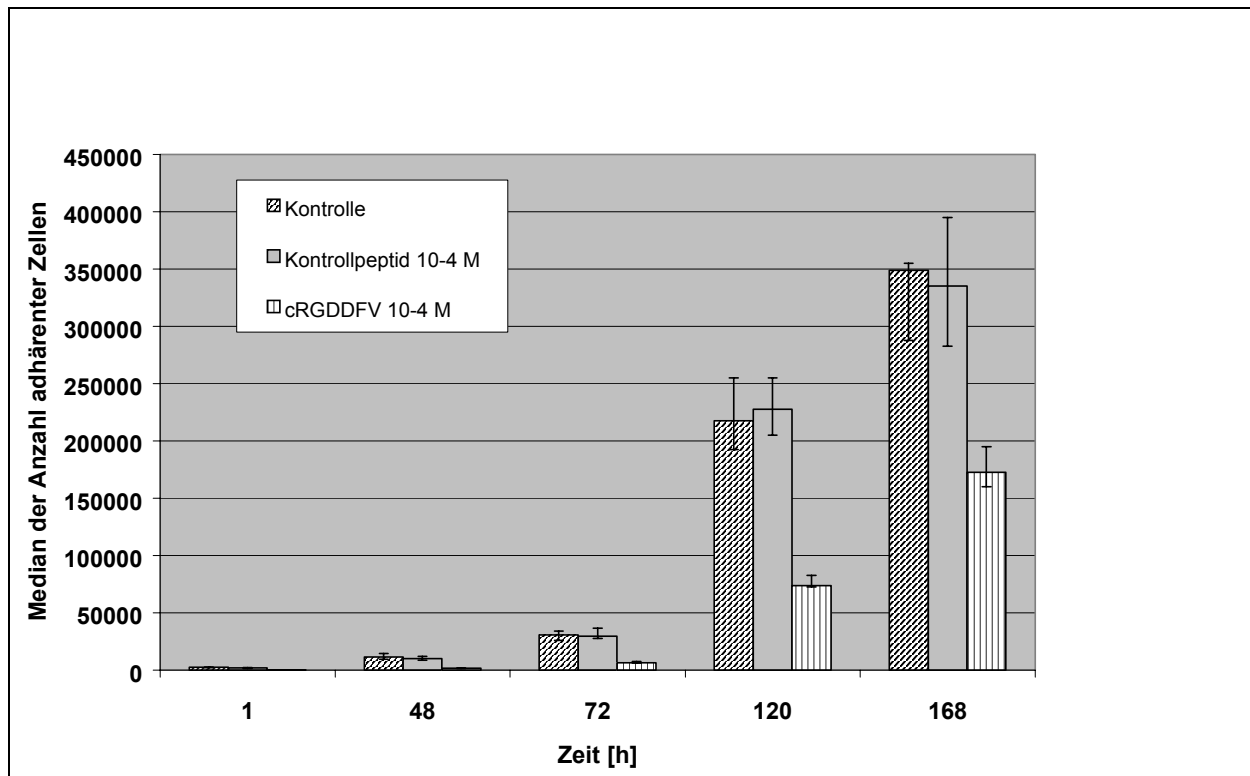


**Abb. 4.3. a)**

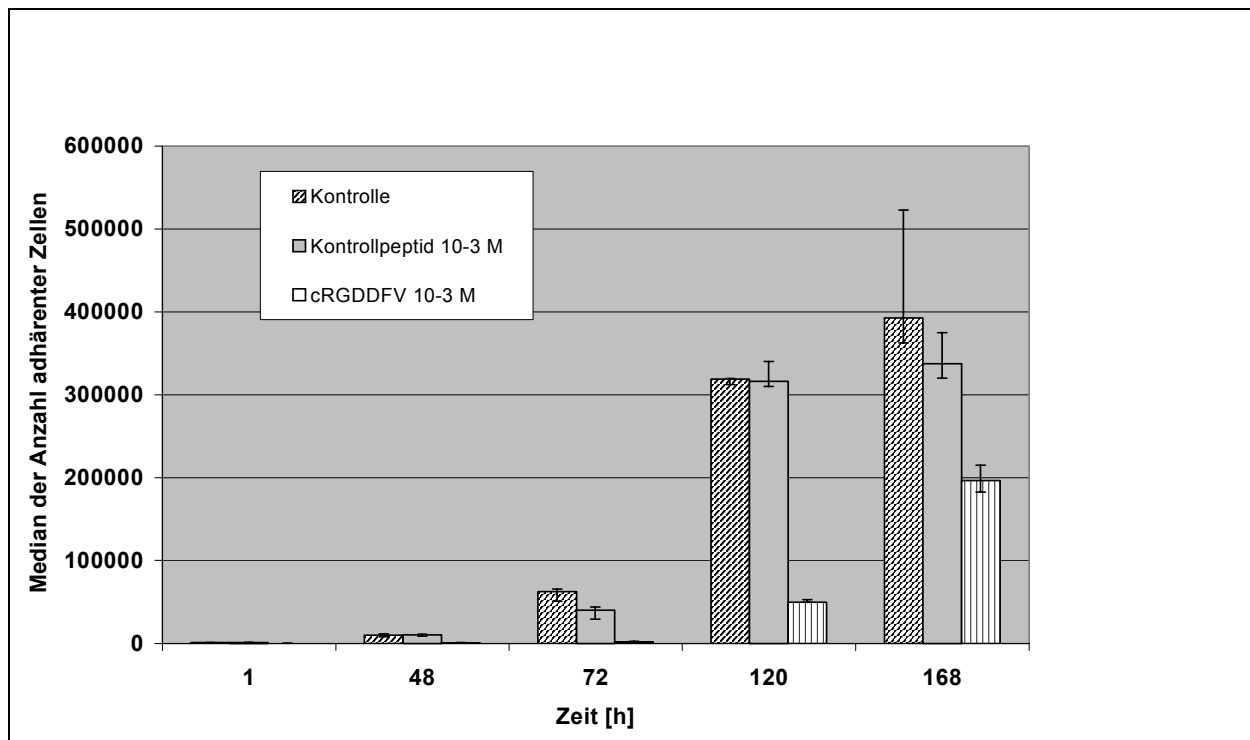


**Abb. 4.3. b)**

**Abb. 4.3. a) und b):** 7-Tages-Adhäsionsexperiment boviner LEC mit 1-stündiger Einwirkung von cRGDDFV  $10^{-3}$  M: **a)** Kontrollpeptid-Gruppe und **b)** cRGDDFV 168 Stunden nach Beginn des Experimentes. Die Zell-Layer sind in beiden Gruppen konfluent, wobei in **Abb. 4.3. a)** noch kleine Zellzwischenräume zu sehen sind. (jeweils hundertfache Vergrößerung)



**Abb. 4.4. a)**



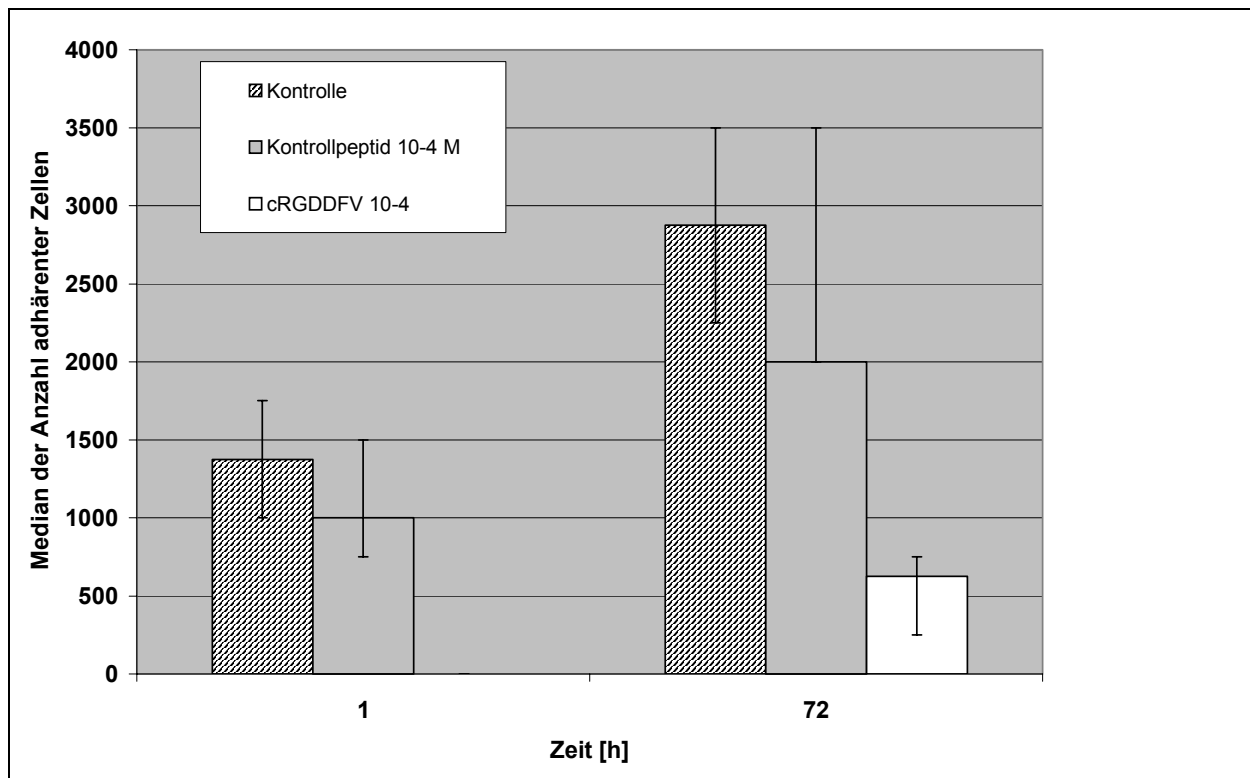
**Abb. 4.4. b)**

**Abb. 4.4. a) und b):** 7-Tages-Adhäsionsexperiment boviner LEC mit 1-stündiger Einwirkung von cRGDDFV a)  $10^{-4}$  M und b)  $10^{-3}$  M: Mediane der Anzahl adhärenter Zellen. Als Parameter für die Streuung der Werte werden die oberen und unteren Quartile der Mediane angezeigt. (Adhäsion auf dem Boden eines 12-Well-dish; n=6)

#### 4.2. Untersuchungen zum Adhäsionsverhalten *humaner* Linsenepithelzellen unter cRGDDFV auf dem Boden der Kulturschale

Ebenso wie unter 4.1. für die bovinen LEC beschrieben, untersuchte man unterschiedliche Inkubationszeiten (5 Tage bzw. 1 Stunde) mit cRGDDFV bzw. Kontrollpeptid.

Wurden humane LEC für **5 Tage** mit **cRGDDFV** in einer Konzentration von  **$10^{-4}$  M** inkubiert, so betrug die Adhäsionshemmung am Boden der Kulturschale am fünften Tag des Experimentes 68,8 %. Verglichen mit der Adhäsionshemmung, die unter gleichen Bedingungen bei bovinen LEC erreicht worden war, bedeutete dies eine um 31,2 % geringere adhäsionsinhibierende Wirkung von cRGDDFV bei humanen LEC. Eine Konfluenz der Zellrasen wurde in keiner der drei Gruppen bis zum fünften Tag erreicht (s. Tab. 4.3. und Abb. 4.5.). Zwischen den Medianen der Anzahl adhärenter Zellen bestand ein statistisch signifikanter Unterschied ( $p < 0,0001$ ). Im paarweise multiplen Vergleich nach Dunn zeigte sich zwischen Kontrollgruppe und Kontrollpeptid-Gruppe kein statistisch signifikanter Unterschied ( $p > 0,05$ ).

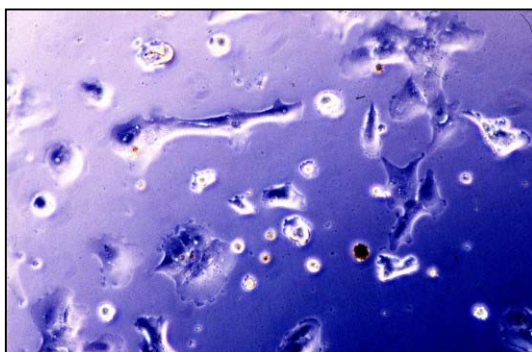


**Abb. 4.5.:** 5-Tages-Adhäsionsexperiment humaner LEC mit permanenter Einwirkung von cRGDDFV  $10^{-4}$  M: Mediane der Anzahl adhärenter Zellen.

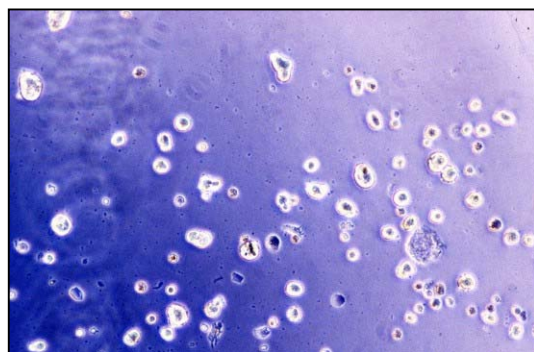
Als Parameter für die Streuung der Werte werden die oberen und unteren Quartile der Mediane angezeigt. (Adhäsion auf dem Boden eines 24-Well-dish; n=6)

Zeit [h]	Kontrolle	Kontr.peptid	cRGDDFV $10^{-4}$ M
1	1375	1000	0
72	2875	2000	625

**Tab. 4.3.:** 5-Tages-Adhäsionsexperiment humaner LEC unter permanenter Einwirkung von cRGDDFV  $10^{-4}$  M: Mediane der Anzahl adhärenter Zellen.



**Abb. 4.6. a)**

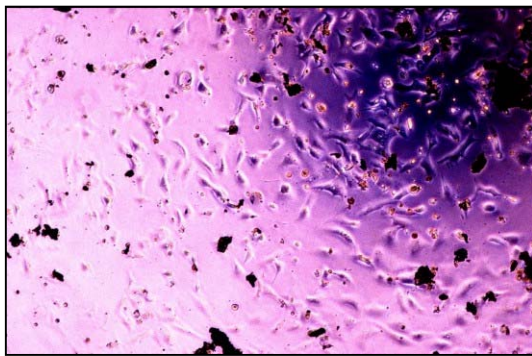


**Abb. 4.6. b)**

**Abb. 4.6. a) und b):** 7-Tages-Adhäsionsexperiment humaner LEC unter 1-stündiger Einwirkung von cRGDDFV  $10^{-3}$  M: **a)** Kontrollpeptid-Gruppe und **b)** cRGDDFV 72 Stunden nach Beginn des Experimentes. In **Abb. 4.6. b)** sind keine adhärenter Zellen zu sehen (jeweils zweihundertfache Vergrößerung).

Wurden die humanen LEC hingegen nur für **eine Stunde** mit **cRGD<sub>D</sub>FV 10<sup>-3</sup> M** inkubiert, so zeigte sich eine Inhibition der Adhäsion auf dem Boden der Kulturschale von 100 % am siebten Tag (s. Tab. 4.4. und Abb. 4.6. und 4.7. a) und b) sowie 4.8.).

Zwischen den Medianen der Anzahl adhärenter Zellen bestand ein statistisch signifikanter Unterschied ( $p < 0,0001$ ). Im paarweise multiplen Vergleich nach Dunn zeigte sich zwischen Kontrollgruppe und Kontrollpeptid-Gruppe kein statistisch signifikanter Unterschied ( $p > 0,05$ ).



**Abb. 4.7. a)**

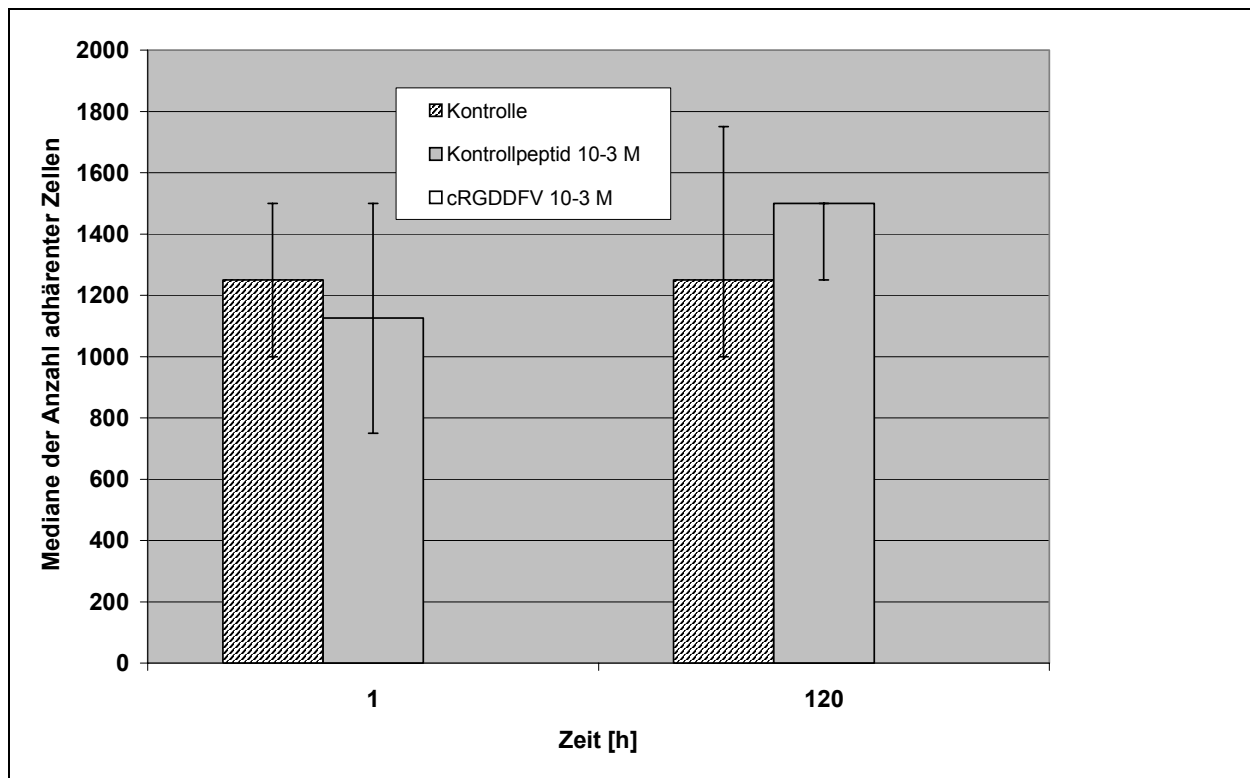


**Abb. 4.7. b)**

**Abb. 4.7. a) und b):** 7-Tages-Adhäsionsexperiment humaner LEC unter 1-stündiger Einwirkung von cRGD<sub>D</sub>FV 10<sup>-3</sup> M: **a)** Kontrollpeptid-Gruppe und **b)** cRGD<sub>D</sub>FV 168 Stunden nach Beginn des Experimentes (jeweils hundertfache Vergrößerung). In **Abb. 4.7. b)** ist lediglich Zelldetritus zu sehen.

Zeit [h]	Kontrolle	Kontr.peptid	cRGD <sub>D</sub> FV 10 <sup>-3</sup> M
1	1250	1125	0
120	1250	1500	0

**Tab. 4.4.:** 7-Tages-Adhäsionsexperiment humaner LEC unter 1-stündiger Einwirkung von cRGD<sub>D</sub>FV 10<sup>-3</sup> M: Mediane der Anzahl adhärenter Zellen.



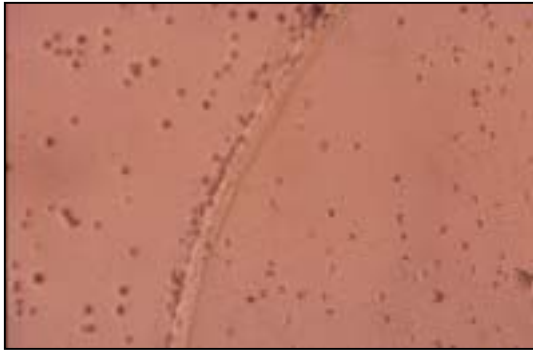
**Abb. 4.8.:** 7-Tages-Adhäsionsexperiment humaner LEC unter 1-stündiger Einwirkung von cRGDDFV 10<sup>-3</sup> M: Mediane der Anzahl adhärenter Zellen.

Als Parameter für die Streuung der Werte werden die oberen und unteren Quartile der Mediane angezeigt. (Adhäsion auf dem Boden eines 24-Well-dish; n=6)

#### 4.3. Untersuchungen zum Adhäsionsverhalten *humaner* und *boviner* Linseneptithelzellen unter cRGDDFV auf exzidierten bovinen Vorderkapseln

Unter permanenter Einwirkung von cRGDDFV 10<sup>-3</sup> M gelang es den humanen (s. Abb. 4.9. a) bis c) und 4.10. a) und b)) und bovinen (4.11. a) und b) LEC nicht, in der Umgebung der auf dem Boden der Kulturschale liegenden Kapselexzidate zu adhären. Dadurch befanden sich in der cRGDDFV-Gruppe alle eingegebenen Zellen auf der Kapsel. In der Kontroll- bzw. Kontrollpeptid-Gruppe verteilten sich die Zellen sowohl auf der Kapsel als auch auf dem nicht von der Kapsel bedeckten Boden der Kulturschale. Bereits am dritten Tag befanden sich lichtmikroskopisch mehr Zellen auf den Kapseln der cRGDDFV-Gruppe als auf denen der Kontroll- bzw. Kontrollpeptid-Gruppe. Zu keinem Zeitpunkt konnte eine geringere Adhäsion der Zellen auf den Kapseln der cRGDDFV-Gruppe als auf denen der anderen beiden Gruppen festgestellt werden.

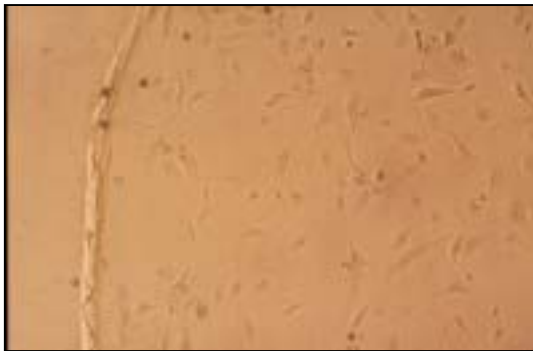
Ein Unterschied im Adhäsionsverhalten zwischen bovinen und humanen LEC konnte nicht beobachtet werden, die humanen LEC zeigten lediglich ein wesentlich langsameres Wachstumsverhalten.



**Abb. 4.9. a)**



**Abb. 4.9. b)**



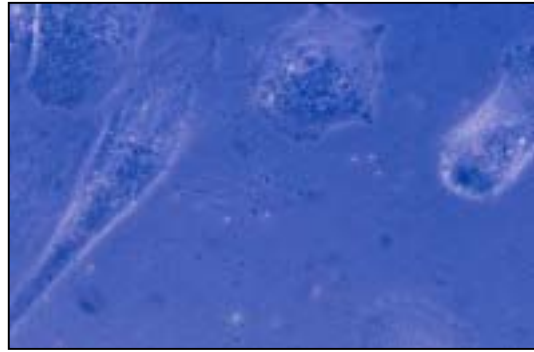
**Abb. 4.9. c)**

**Abb. 4.9. a), b) und c):** Humane LEC auf bovinen Linsenkapseln: **a)** zu Beginn des Experimentes, direkt nach Zugabe der Zellen in das Well der Kulturschale, **b)** am 4. Tag des Experimentes unter permanenter Einwirkung des Kontrollpeptids  $10^{-3}$  M und **c)** am 4.Tag des Experimentes unter permanenter Einwirkung von cRGDβFV  $10^{-3}$  M. In **Abb. 4.9. c)** ist zu erkennen, daß den Zellen unter Anwesenheit von cRGDβFV  $10^{-3}$  M die Adhäsion lediglich auf der Linsen-kapsel, nicht jedoch auf dem Boden der Kulturschale gelingt. (**a) bis c)** in hundertfacher Vergrößerung).



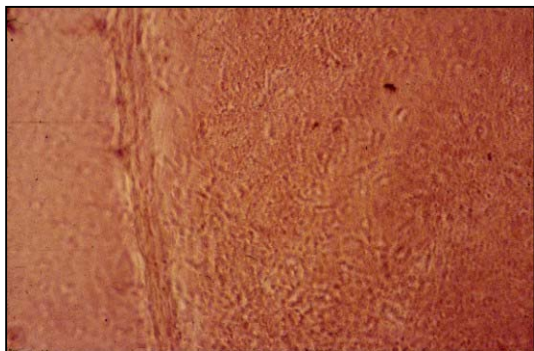


**Abb. 4.10. a)**

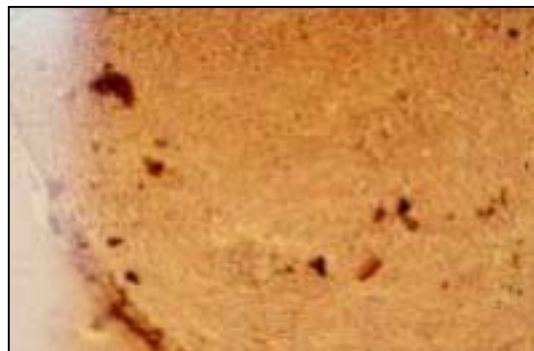


**Abb. 4.10. b)**

**Abb. 4.10. a) und b):** Experiment wie in Abb. 4.9. a) bis c): Humane LEC auf boviner Linsenkapsel **a)** cRGD<sub>D</sub>FV  $10^{-3}$  M und **b)** Kontrollpeptid  $10^{-3}$  M am 4. Tag des Experimentes (in vierhundertfacher Vergrößerung).



**Abb. 4.11. a)**



**Abb. 4.11. b)**

**Abb. 4.11. a) und b):** Bovine LEC auf bovinen Linsenkapseln: nach 4-tägiger Inkubation mit **a)** Kontrollpeptid  $10^{-4}$  M und **b)** cRGD<sub>D</sub>FV  $10^{-4}$  M (fünfzigfache Vergrößerung). Es besteht kein Unterschied in der Zelldichte auf den Kapseln beider Gruppen.

#### 4.4. Untersuchungen zum Ablösungsverhalten konfluenter Linsenepithelzellen

##### 4.4.1. Ablösung boviner LEC vom Boden der Kulturschale

Vom Boden der Kulturschale begannen sich die bovinen LEC bereits zehn Minuten nach Zugabe des cRGD<sub>D</sub>FV ( $10^{-4}$  M) vom Rand des Wells her zu lösen (s. Abb. 4.12. b)). Nach 35 bzw. 37 Minuten (zwei Experimente) befanden sich nur noch abgelöste größere Zell-Konglomerate in der Kulturschale – diese bereits oben schwimmend. Es waren keine Zellen mehr adhärent (s. Abb. 4.12. c)). Dieses Verhalten war völlig unabhängig davon, ob es sich um einen intakten Zellrasen oder um einen mit einer zentral (mittels modifiziertem Trepan) gesetzten Wunde handelte. Wells, die mit 10%igem Me-



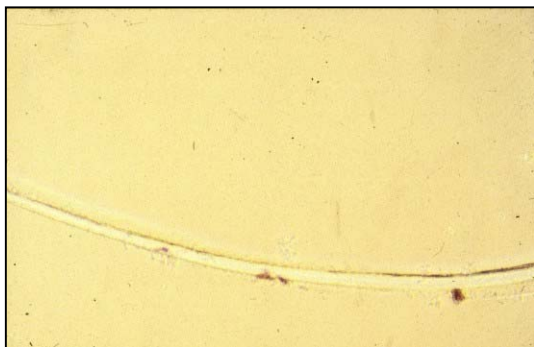
dium (Kontrollgruppe) oder dem Kontrollpeptid ( $10^{-4}$  M) inkubiert wurden, zeigten auch nach zwei Tagen einen intakten Zellrasen um die Wunde. Die Wunden der Kontroll- bzw. Kontrollpeptid-Gruppe hatten sich nach zwei Tagen geschlossen (s. Abb. 4.12. a)). In der cRGD $\Delta$ FV-Gruppe kam es zu keiner erneuten Adhäsion der Zellen.



**Abb. 4.12. a)**



**Abb. 4.12. b)**

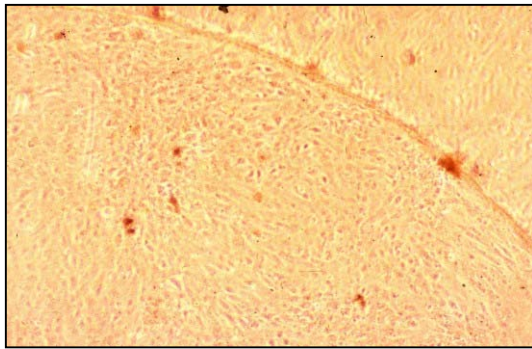


**Abb. 4.12. c)**

**Abb. 4.12. a) bis c):** Ablösung boviner Linsenepithelzellen vom Boden der Kulturschale. In konfluente Zell-Layer wurden mittels eines Trepens zentrale Läsionen gesetzt. Nach zwei Tagen ist in der Kontrollpeptid-Gruppe die Wunde wieder völlig geschlossen (**a**). Nach Zugabe von cRGD $\Delta$ FV  $10^{-4}$  M beginnen sich die Zellen bereits nach zehn Minuten vom Rand des Wells her zu lösen (**b**) (im rechten unteren Bildabschnitt ist der umgeschlagene Zellrasen sichtbar). Nach 37 Minuten sind alle Zellen vom Boden der Kulturschale abgelöst, es ist nur noch die Gravur des Trepens vom Setzen der Läsion am Boden der Kulturschale sichtbar (**c**). (jeweils fünfzigfache Vergrößerung)

#### **4.4.2. Ablösung boviner LEC von exzidierten bovinen Linsenvorderkapseln**

Nach Zugabe von cRGD $\Delta$ FV  $10^{-4}$  M war bereits nach wenigen Minuten ein Ablösen der Zellen in der Umgebung des Kapselexzidates vom Boden der Kulturschale zu beobachten (s. Kapitel 4.4.1.). Der konfluente Zellrasen auf der Kapsel blieb allerdings im Beobachtungszeitraum von zwei Tagen unverändert, es lösten sich dort keine Zellen ab (s. Abb. 4.13. a) und b).



**Abb. 4.13. a)**



**Abb. 4.13. b)**

**Abb. 4.13. a) und b):** Konfluente bovine LEC auf bovinen exzidierten Linsenvorderkapseln **a)** vor und **b)** nach Zugabe von cRGD $\Delta$ FV  $10^{-4}$  M. Auch nach zwei Tagen hatten sich keine Zellen von den Linsenkapseln gelöst. Lediglich auf dem die Kapsel umgebenden Boden der Kulturschale blieben die Zellen nicht adhärent (Zell-Konglomerat am Rand der Kapsel in der **Abb. 4.13. b)** oben links; dort ist auch der zellfreie Boden der Kulturschale zu sehen). (jeweils fünfzigfache Vergrößerung)

#### **4.4.3. Ablösung humaner LEC von humanen Linsenvorderkapseln**

Nach blind durchgeführter Beurteilung der Präparate durch drei Untersucher (s. Tab. 4.5. a) und b)) konnte bei keiner Inkubationszeit bzw. cRGD $\Delta$ FV-Konzentration ein statistisch signifikanter Unterschied zwischen der cRGD $\Delta$ FV-Gruppe bzw. der Kontroll- und Kontrollpeptidgruppe (die letzten beiden zusammengefaßt zu einer „Kontrolle“) festgestellt werden: Die Nullhypothese, daß beide Gruppen der gleichen Grundgesamtheit entstammen, konnte mit  $p=0,1878$  bei 24-stündiger Inkubation mit cRGD $\Delta$ FV  $10^{-4}$  M und  $p=0,0798$  bei 48-stündiger Inkubation mit cRGD $\Delta$ FV  $2 \times 10^{-3}$  M nicht abgelehnt werden (Fischers Exakter Test) (s. Abb. 4.14. bis 4.22. a) und b)).

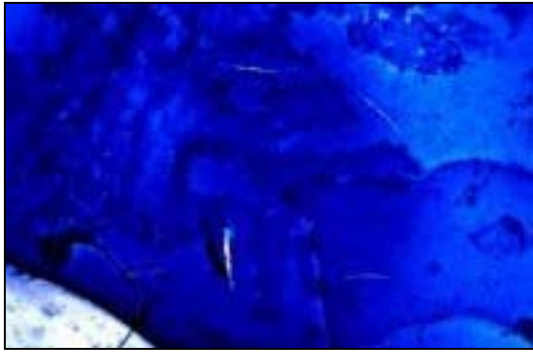
Tatsächlich	Bewertet als	
	cRGD $\Delta$ FV $10^{-4}$	Kontrolle
cRGD $\Delta$ FV $10^{-4}$	24	12
Kontrolle	26	25

**Tab. 4.5. a)**

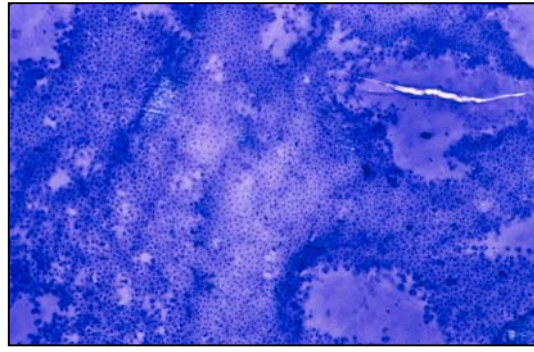
Tatsächlich	Bewertet als	
	cRGD $\Delta$ FV $2 \times 10^{-3}$	Kontrolle
cRGD $\Delta$ FV $2 \times 10^{-3}$	14	10
Kontrolle	7	17

**Tab. 4.5. b)**

**Tab. 4.5. a) und b):** Beurteilung der Anzahl adhärenter und vitaler Zellen auf intraoperativ gewonnenen humanen Linsenvorderkapseln nach **a)** 24-stündiger Inkubation mit cRGD $\Delta$ FV  $10^{-4}$  M bzw. **b)** 48-stündiger Inkubation mit cRGD $\Delta$ FV  $2 \times 10^{-3}$  M. Pro Feld ist die Summe der durch drei unabhängige Untersucher zugeordneten Präparate angegeben.

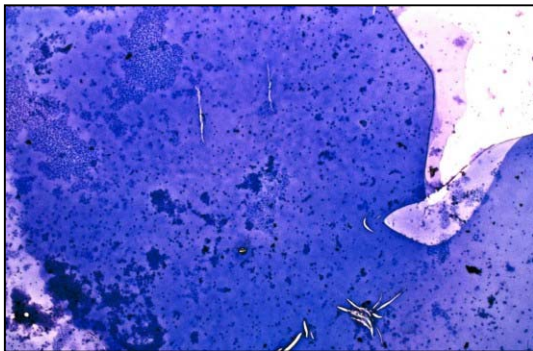


**Abb. 4.14. a)**

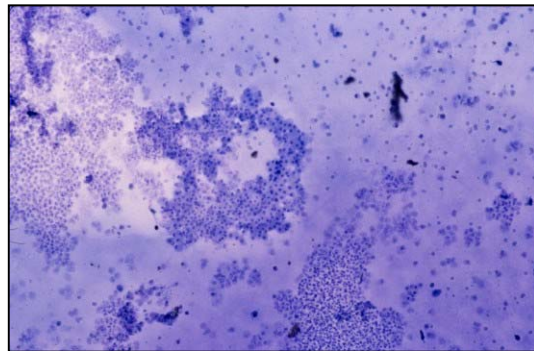


**Abb. 4.14. b)**

**Abb. 4.14. a) und b):** Humane Linsenvorderkapsel nach 24-stündiger Inkubation mit cRGD $\alpha$ FV  $10^{-4}$  M: **a)** fünfzigfache Vergrößerung und **b)** hundertfache Vergrößerung. Es sind große zellbedeckte Areale zu sehen.

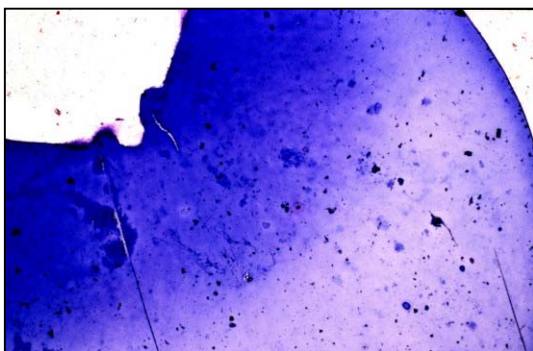


**Abb. 4.15. a)**

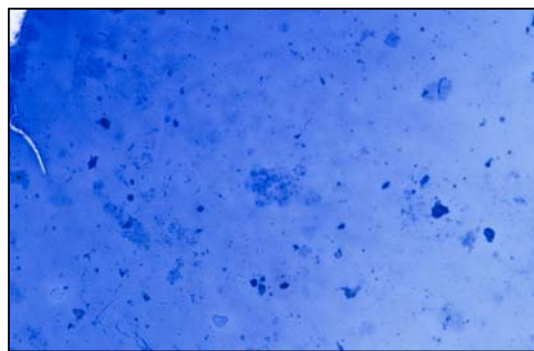


**Abb. 4.15. b)**

**Abb. 4.15. a) und b):** Humane Linsenvorderkapsel nach 24-stündiger Inkubation mit cRGD $\alpha$ FV  $10^{-4}$  M: **a)** fünfzigfache Vergrößerung und **b)** hundertfache Vergrößerung. Vereinzelt befinden sich Zellnester auf der Kapsel.



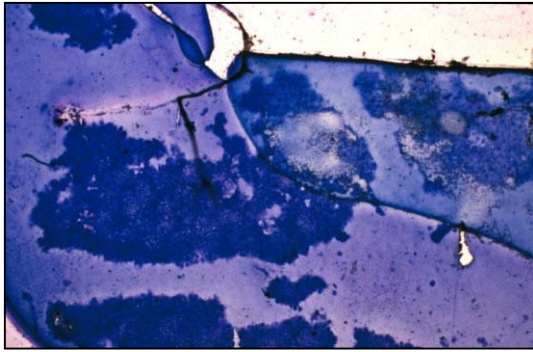
**Abb. 4.16. a)**



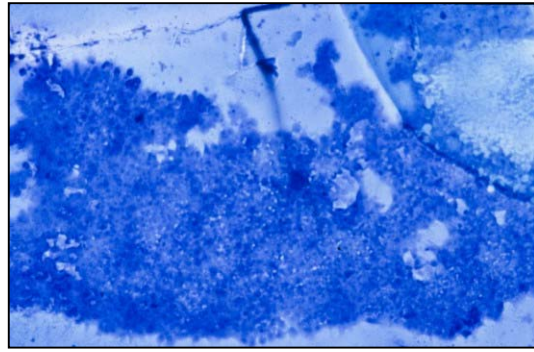
**Abb. 4.16. b)**

**Abb. 4. 16. a) und b):** Humane Linsenvorderkapsel nach 24-stündiger Inkubation mit Kontrollmedium: **a)** fünfzigfache Vergrößerung und **b)** hundertfache Vergrößerung. Es befinden sich keine Zellen auf der Kapsel.



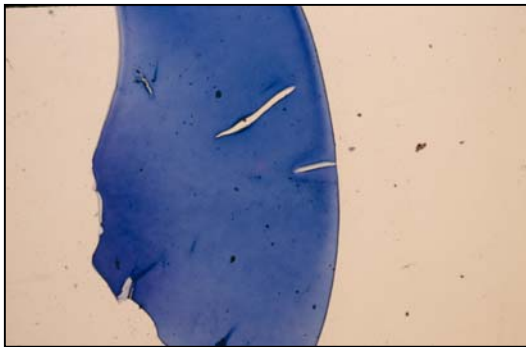


**Abb. 4.17. a)**



**Abb. 4.17. b)**

**Abb. 4.17. a) und b):** Humane Linsenvorderkapsel nach 24-stündiger Inkubation mit Kontrollpeptid  $10^{-4}$  M: **a)** fünfzigfache Vergrößerung und **b)** hundertfache Vergrößerung. Die Kapsel ist von großen Zellnestern bedeckt.

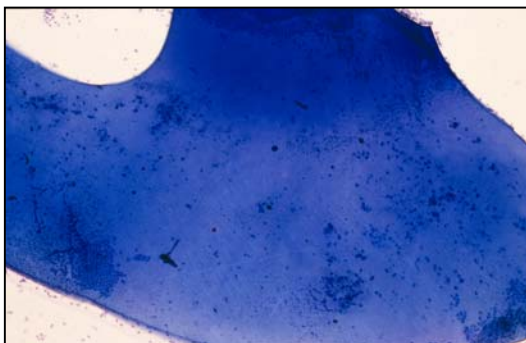


**Abb. 4.18. a)**

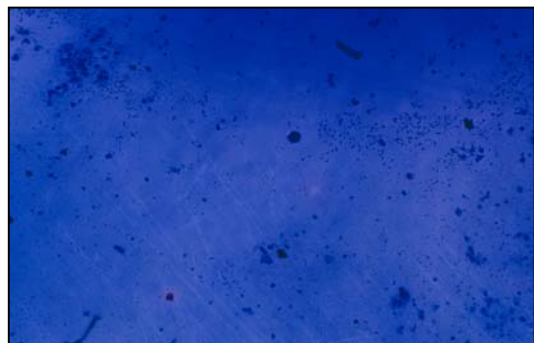


**Abb. 4.18. b)**

**Abb. 4.18. a) und b):** Humane Linsenvorderkapsel nach 48-stündiger Inkubation mit cRGD<sub>DFV</sub>  $2,5 \times 10^{-3}$  M: **a)** fünfzigfache Vergrößerung und **b)** hundertfache Vergrößerung. Die Kapsel ist völlig zellfrei.

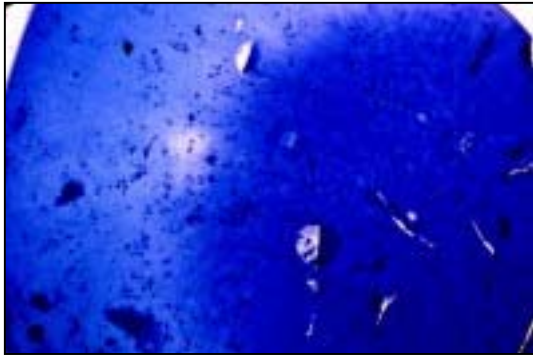


**Abb. 4.19. a)**

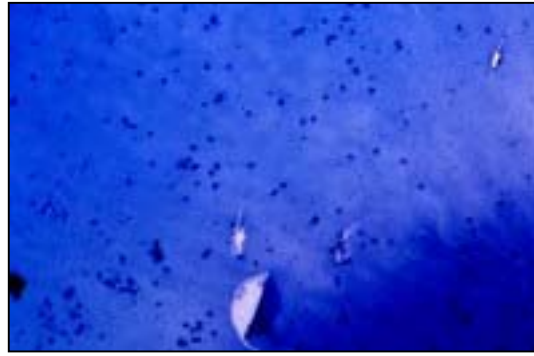


**Abb. 4.19. b)**

**Abb. 4.19. a) und b):** Humane Linsenvorderkapsel nach 48-stündiger Inkubation mit cRGD<sub>DFV</sub>  $2,5 \times 10^{-3}$  M: **a)** fünfzigfache Vergrößerung und **b)** hundertfache Vergrößerung. Auf der Kapsel befindet sich nur Zelldetritus.

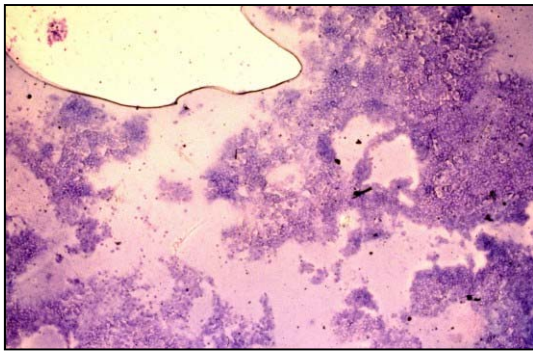


**Abb. 4.20. a)**

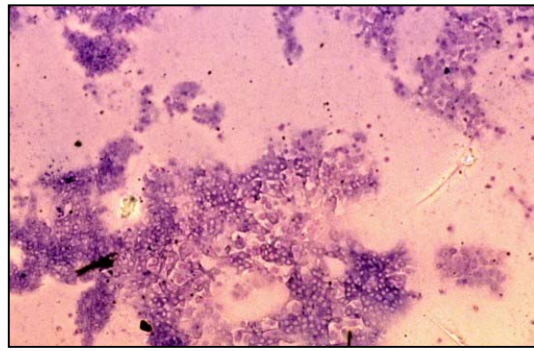


**Abb. 4.20. b)**

**Abb. 4.20. a) und b):** Humane Linsenvorderkapsel nach 48-stündiger Inkubation mit Kontrollmedium: **a)** fünfzigfache Vergrößerung und **b)** hundertfache Vergrößerung. Auf der Kapsel befindet sich nur Zelldetritus.

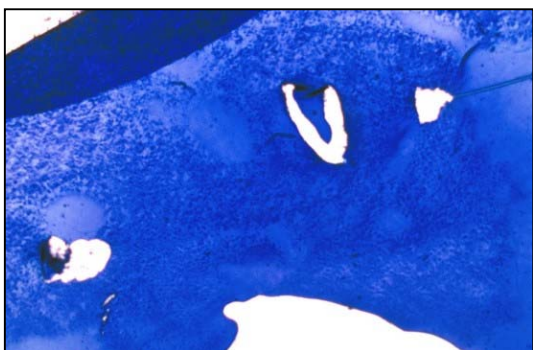


**Abb. 4.21. a)**



**Abb. 4.21. b)**

**Abb. 4.21. a) und b):** Humane Linsenvorderkapsel nach 48-stündiger Inkubation mit Kontrollpeptid  $2 \times 10^{-3}$  M: **a)** fünfzigfache Vergrößerung und **b)** hundertfache Vergrößerung. Auf der Kapsel befinden sich große Zellnester.



**Abb. 4.22. a)**



**Abb. 4.22. b)**

**Abb. 4.22. a) und b):** Humane Linsenvorderkapsel nach 48-stündiger Inkubation mit Kontrollmedium: **a)** fünfzigfache Vergrößerung und **b)** hundertfache Vergrößerung. Die Kapsel ist nahezu vollständig von Zellen bedeckt.



#### 4.4.4. Ablösung humaner LEC von humanen Linsenkapseln mit IOL-Implantat

Nach dreitägiger Inkubation waren die Zellen auf der in cRGD<sub>h</sub>FV  $10^{-4}$  M inkubierten Kapsel bzw. IOL blasig verändert, z.T. hatten sich Zellkonglomerate gebildet. Die Zellen der in Kontrollpeptid inkubierten Kapsel mit IOL waren unverändert (s. Abb. 4.23. a) bis c) und 4. 24. a) und b)).

Durch die Spülung mit der Kulturlösung zwischen den Kapselblättern bzw. zwischen Kapsel und IOL konnten bereits nach ca. drei Minuten die ersten sich am Äquator befindenden Zellen der cRGD<sub>h</sub>FV -Gruppe abgelöst werden. Nach insgesamt sieben Minuten waren nahezu alle Zellen entfernt (s. Abb. 4.25. a) und b)). Trotz intensiver Spülung mit maximal möglichem Druck ließen sich auch nach sieben Minuten kaum Zellen zwischen den Kapselblättern bzw. zwischen Kapsel und IOL der in Kontrollmedium inkubierten Kapsel lösen. Zellfreie Areale auf der Kapsel bzw. der IOL entstanden nicht, lediglich einige Zellkonglomerate (s. Abb. 4.26. a) bis d)).

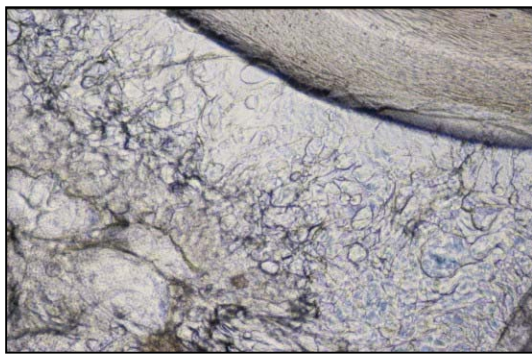


Abb. 4.23. a)

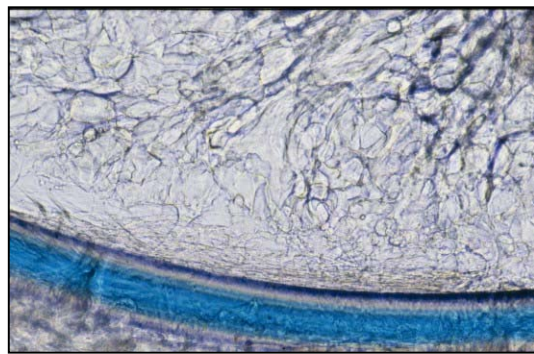


Abb. 4.23. b)

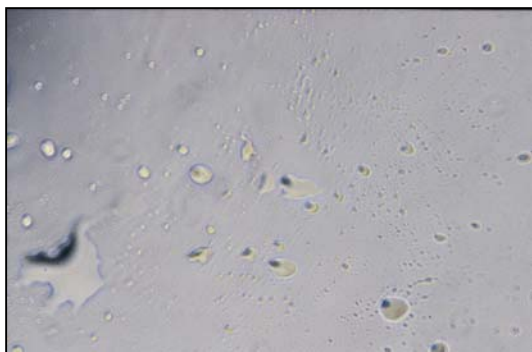
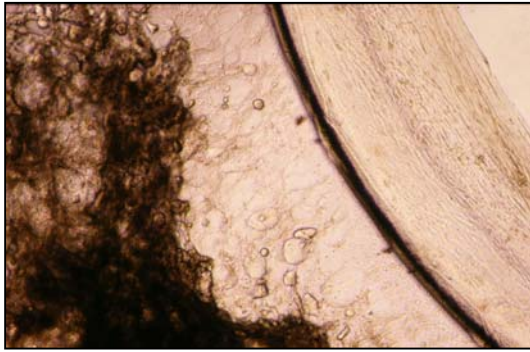
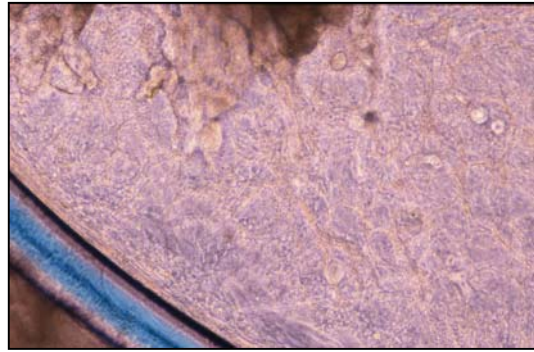


Abb. 4.23. c)

**Abb. 4.23. a) und b):** IOL im Kapselsack eines Organspenders: vor der Inkubation mit cRGD<sub>h</sub>FV  $10^{-4}$  M zeigte sich ein dichter regenerativer Nachstar im Kapselsack (der Rand der Kapsulorrhexis befindet sich jeweils rechts oben; in **Abb. 4.23. b)** ist die blaue Haptik der IOL zu sehen). **Abb. 4.23. c)** zeigt die schon zu Beginn des Experimentes zellfreie Optik der IOL. (alle Abbildungen in hundertfacher Vergrößerung)



**Abb. 4.24. a)**

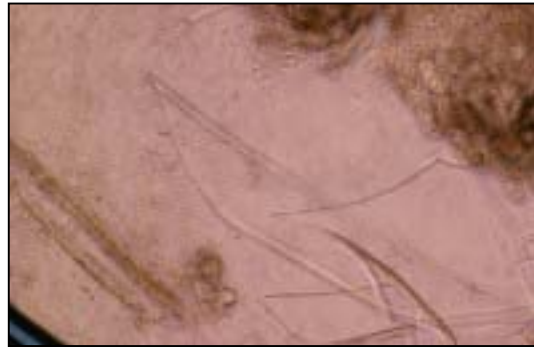


**Abb. 4.24. b)**

**Abb. 4.24. a) und b):** Entspricht Abb. 4.23. a) und b) am 3. Tag des Experimentes *vor* der Spülung des Kapselsackes. Unter cRGD $\alpha$ FV  $10^{-4}$  M hatten sich bereits Zellen von der Kapsel gelöst und zu dichten Zellkonglomeraten (in den Fotos dunkel erscheinend) zusammengelagert. (alle Abbildungen in hundertfacher Vergrößerung)



**Abb. 4.25. a)**

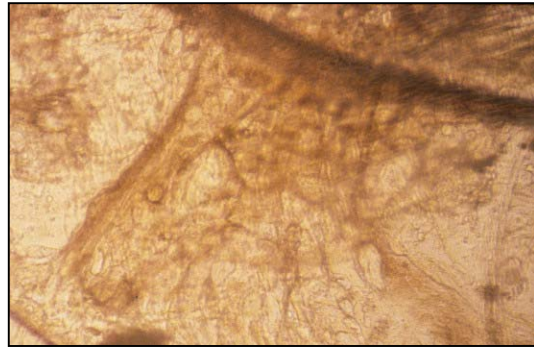


**Abb. 4.25. b)**

**Abb. 4.25. a) und b):** Entspricht Abb. 4.23. a) und b) am 3. Tag des Experimentes *nach* siebenminütiger Spülung des Kapselsackes (cRGD $\alpha$ FV  $10^{-4}$  M). Es sind zellfreie Bezirke auf der Linsenkapsel zu sehen. In **Abb. 4.25. a)** am linken Bildrand und in **Abb. 4.25. b)** am rechten oberen Bildrand befinden sich gelöste Zellkonglomerate. Am linken unteren Bildrand in **Abb. 4.25. b)** ist wiederum die blaue Haptik der IOL zu erkennen; es sind durch das Spülen z.T. kleine Kapseldefekte entstanden. In beiden Abbildungen befindet sich die Kapsulorrhexis am rechten oberen Bildrand. (alle Abbildungen in hundertfacher Vergrößerung)



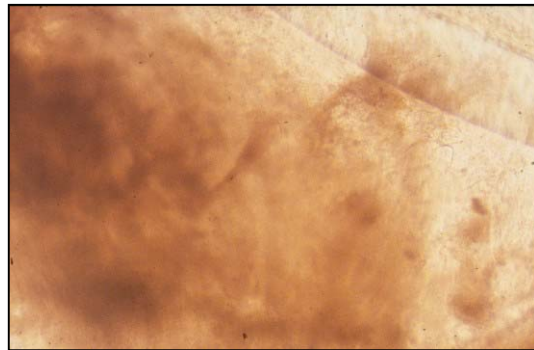
**Abb. 4.26. a)**



**Abb. 4.26. b)**



**Abb. 4.26. c)**



**Abb. 4.26. d)**

**Abb. 4.26. a) bis d):** In Kontrollpeptid  $10^{-4}$  M inkubierte IOL im Kapselsack eines Organspenders. Das optische Zentrum war klar, jedoch zeigte sich ein deutlicher regenerativer und fibrotischer Nachstar im Sinne einer Soemmerring-Ringkatarakt (s. **Abb. 4.26. a) und b)**). Nach viertägiger Inkubation in Kontrollpeptid war es zu keiner Veränderung im Vergleich zum Zustand vor Beginn des Experimentes gekommen. Nach zehnminütiger Spülung zwischen den Kapselblättern entstanden keine zellfreien Areale, lediglich einige Zellkonglomerate waren sichtbar (**Abb. 4.26. c) und d)**). (Vergrößerung in **Abb. 4.26. a) und c)** fünfzigfach, in **Abb. 4.26. b) und d)** hundertfach)



## 4.5. Untersuchungen zum Einfluß von cRGD $\alpha$ FV auf das Hornhautendothel

### 4.5.1. Hornhautendothelzell-Layer auf dem Boden der Kulturschale

Bereits 30 Minuten nach Zugabe von cRGD $\alpha$ FV  $10^{-4}$  M begannen sich im Zellrasen dieser Gruppe kleine zellfreie Areale zu bilden. Diese hatten zunächst eine Größe von ein bis zwei Zellen. Am Ende der ersten Stunde nach Zugabe von cRGD $\alpha$ FV hatten sich die Defekte im Zellrasen dann etwa auf 5-Zellen-Größe erweitert. Nach 4,75 Stunden waren die defekten Bezirke so weit vergrößert, daß das Experiment abgebrochen und die Zellen gefärbt und fixiert wurden. Die zellfreien Bezirke zeigten ein alveolenartiges Aussehen (s. Abb. 4.27. a) und b)).

Die Zell-Layer der Kontroll- bzw. Kontrollpeptid-Gruppe blieben hingegen während der gesamten 4,75 Stunden unverändert geschlossen (s. Abb. 4.27. c)).

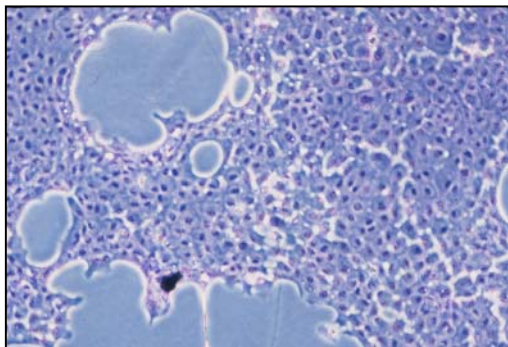


Abb. 4.27. a)

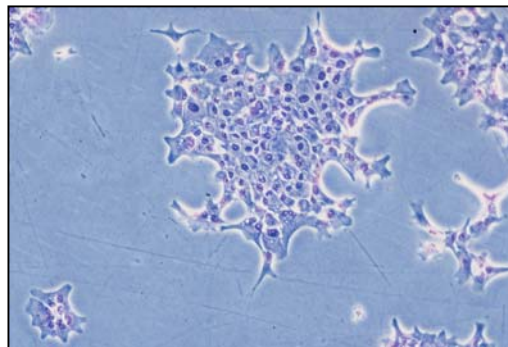


Abb. 4.27. b)

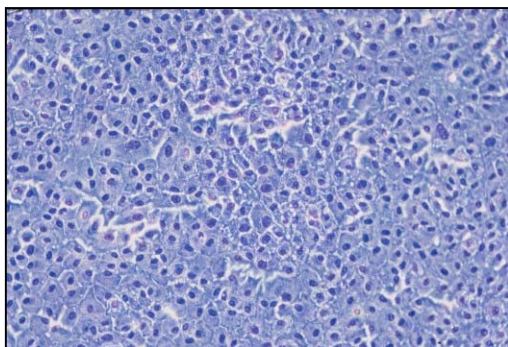
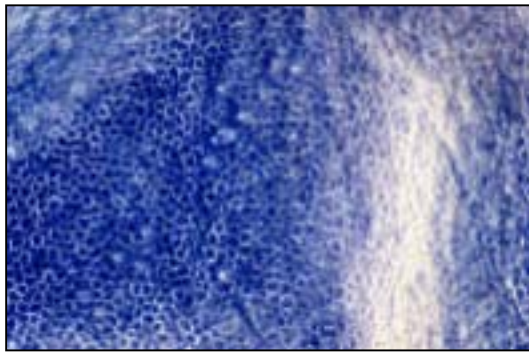


Abb. 4.27. c)

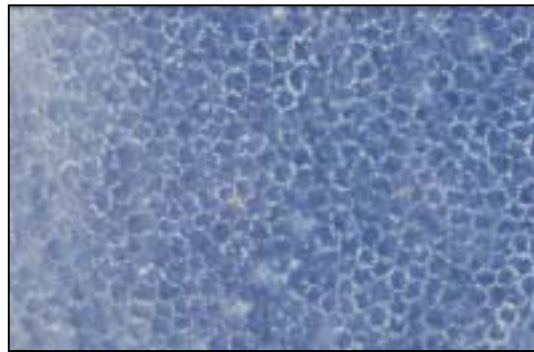
**Abb. 4.27. a), b) und c):** Auf konfluente bovine Hornhaut-Endothel-Zellen am Boden der Kulturschale wurde **a) und b)** cRGD $\alpha$ FV bzw. **c)** Kontrollpeptid (jeweils in einer Konzentration von  $10^{-4}$  M) gegeben. Nach 4,75 Stunden Inkubationszeit zeigten sich in der cRGD $\alpha$ FV-Gruppe alveolenartige Defekte im Zellrasen bis hin zu nur noch vereinzelt Zellnestern. Die Kontrollpeptid-Gruppe wies keine Veränderungen auf. (hundertfache Vergrößerung)

#### **4.5.2. Hornhautendothel und –epithel humaner Hornhäute**

Nach 24- bzw. 48-stündiger Inkubation der Hornhaut mit cRGD<sub>D</sub>FV  $2 \times 10^{-3}$  M konnte nach neuerlicher Anfärbung des Endothels bzw. Epithels mit Trypan-Blau Farblösung keine Zunahme der avitalen Bezirke – im Vergleich zum Ausgangsbefund – festgestellt werden. Beide Hornhäute erlitten keinen Endothel- (s. Abb. 4.28 bis 4.30. a) und b)) bzw. Epithelzellverlust (s. Abb. 4.31. a) und b)) bzw. keine Schädigung desselben durch cRGD<sub>D</sub>FV. Es war lediglich eine Zunahme der Faltenbildung zu verzeichnen. Mikroskopisch konnte kein Unterschied zwischen den Befunden 24 Stunden bzw. 48 Stunden nach Beginn des Experimentes festgestellt werden. In den Abbildungen ist eine der zwei untersuchten Hornhäute exemplarisch dargestellt, da der Verlauf in beiden Fällen gleich war.

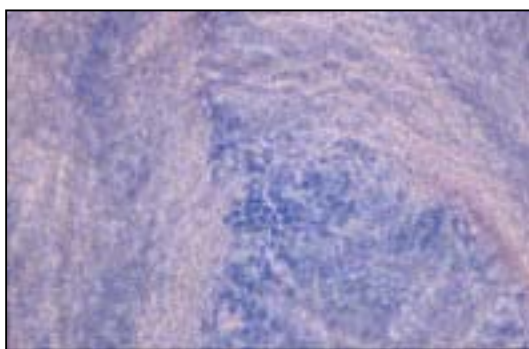


**Abb. 4.28. a)**

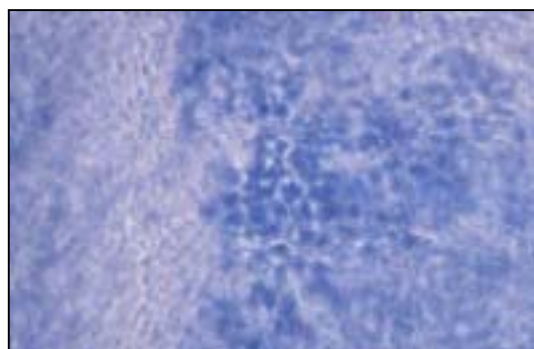


**Abb. 4.28. b)**

**Abb. 4.28. a) und b):** Zentrales Hornhautendothel vor Zugabe von cRGD<sub>D</sub>FV  $2 \times 10^{-3}$  M (a) in fünfzigfacher und b) in hundertfacher Vergrößerung).



**Abb. 4.29. a)**

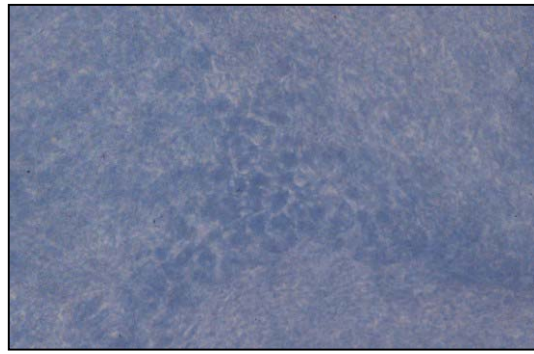


**Abb. 4.29. b)**

**Abb. 4.29. a) und b):** Zentrales Hornhautendothel 24 Stunden nach Zugabe von cRGD<sub>D</sub>FV  $2 \times 10^{-3}$  M. (a) in fünfzigfacher und b) in hundertfacher Vergrößerung)

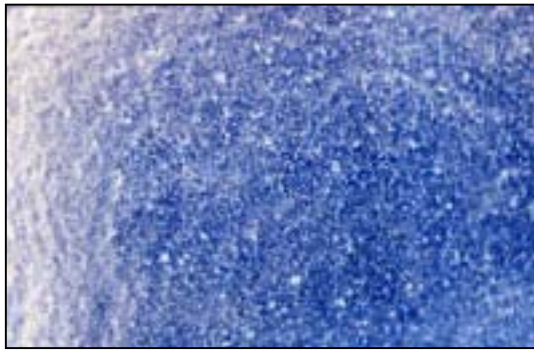


**Abb. 4.30. a)**



**Abb. 4.30. b)**

**Abb. 4.30. a) und b):** Zentrales Hornhautendothel 48 Stunden nach Zugabe von cRGD $\Delta$ FV  $2 \times 10^{-3}$  M. (**a**) in fünfzigfacher und **b**) in hundertfacher Vergrößerung)



**Abb. 4.31. a)**



**Abb. 4.31. b)**

**Abb. 4.31. a):** Zentrales Hornhautepithel vor Zugabe von cRGD $\Delta$ FV  $2 \times 10^{-3}$  M (in hundertfacher Vergrößerung). Durch eine Zunahme der Quellung und damit der Faltenbildung sind die Epithelzellen nach 48 Stunden Inkubationszeit (**b**), in hundertfacher Vergrößerung) nicht mehr beurteilbar. Eine verstärkte Blaufärbung, die auf eine Zunahme avitaler Zellen schließen ließe, lag jedoch nicht vor.

## 5. Diskussion

### 5.1. Diskussion der Ergebnisse

Das Ziel der hier vorliegenden Untersuchungen bestand darin, die Möglichkeiten der Nachstarprävention mittels des von uns verwendeten zyklischen RGD-Peptids cRGD<sub>D</sub>FV in in-vitro-Modellen zu prüfen. Es wurde zum einen dessen Auswirkung auf die Adhäsion von humanen bzw. bovinen Linsenepithelzellen (LEC) beobachtet, zum anderen die Frage beantwortet, ob auch bereits adhärente LEC von ihrer Adhäsionsoberfläche wieder abgelöst werden können.

Schließlich galt es, mit Blick auf einen klinischen Einsatz von cRGD<sub>D</sub>FV, dessen Wirkung auf andere okuläre Strukturen, hier speziell auf das Hornhautendothel, zu untersuchen.

#### **5.1.1. Diskussion der Ergebnisse zu Adhäsion und Proliferation der LEC auf dem Boden der Kulturschale**

Für die Untersuchung der Adhäsion der LEC in Anwesenheit von cRGD<sub>D</sub>FV verwendeten wir zunächst das Modell der unbeschichteten Kulturschale. Insbesondere in Bezug auf die Bestimmung der Anzahl adhärenter Zellen bietet diese Methode den Vorteil einer einfachen Versuchsdurchführung. Außerdem war auf diese Weise ein annähernder Vergleich der adhäsionshemmenden Potenz des von uns verwendeten cRGD<sub>D</sub>FV mit dem von Palmade et al. [56] gebrauchten LCM 1910 möglich.

Die Inhibition der Adhäsion **boviner LEC** auf dem **Boden der Kulturschale** war bei einer Langzeit-Inkubation mit cRGD<sub>D</sub>FV schon bei sehr geringen Konzentrationen desselben nahezu vollständig (**nach 5 Tagen** Inkubation mit cRGD<sub>D</sub>FV  $10^{-4}$  M 100 % Adhäsionshemmung im Vergleich zur Kontrollpeptid-Gruppe). Die Inhibition der Adhäsion **humaner LEC** auf dem **Boden der Kulturschale** (im Vergleich zur Kontrollpeptid-Gruppe) betrug unter gleichen Bedingungen nach fünf Tagen 68,8 %.

Diese Inhibition der Adhäsion humaner und boviner LEC auf dem Boden der Kulturschale ist in unseren Untersuchungen bei gleicher Konzentration des zyklischen RGD-Peptids cRGD<sub>D</sub>FV ( $10^{-4}$  M) wesentlich ausgeprägter als es die von Palmade [56] beschriebenen Ergebnisse für bovine LEC mittels LCM 1910 zeigen (ca. 55 % Hemmung der Adhäsion/Proliferation unter siebentägiger Inkubation mit LCM 1910). Daher ist an-

zunehmen, daß das von uns verwendete zyklische RGD-Peptid cRGD<sub>D</sub>FV eine wesentlich größere adhäsions- und proliferationshemmende Potenz besitzt, als das als LCM 1910 bezeichnete RGD-Peptid, das die Arbeitsgruppe um Palmade verwendete. Einschränkung muß man jedoch sagen, daß über das Molekulargewicht und mögliche Substituenten des Peptids keine Angaben gemacht wurden, so daß dieser Vergleich nur annähernd möglich ist.

Auch konnte erstmals gezeigt werden, daß *humane* LEC durch Inkubation mit cRGD<sub>D</sub>FV eine Adhäsionshemmung auch über *mehrere Tage* erfahren. Oharazawa et al. [57] hatten humane LEC lediglich für einen Zeitraum von 3 Stunden mit RGD-Peptid inkubiert. Um dem *in vivo* gegebenen längeren Zeitraum bis zur Entstehung eines Nachstars Rechnung zu tragen, inkubierten wir die humanen LEC für 5 Tage. Allerdings kam es hier bei den Zellen der Kontroll- und Kontrollpeptid-Gruppe zu keiner Proliferation (nach 120 Stunden waren rund 20-30 % der eingesäten Zellen adhärent). So kann lediglich die Aussage getroffen werden, daß nach fünftägiger Inkubation humaner LEC mit cRGD<sub>D</sub>FV in einer Konzentration von  $10^{-4}$  M eine sehr ausgeprägte Adhäsionshemmung zu erzielen war (s.o.).

Den *in-vivo*-Bedingungen entspricht eine fünftägige Inkubation mit RGD-Peptid jedoch nicht. Infolge des Kammerwasser-Turnovers ist mit einem raschen Ausspülen der Wirksubstanz zu rechnen. Unter der Vorstellung, daß ein nur kurzzeitiges Einwirken des RGD-Peptids keinen ausreichenden Hemm-Effekt auf die Adhäsion und Proliferation der LEC haben würde, wurden bereits Versuche zur *verzögerten intraokularen Freisetzung des Peptids* unternommen:

Zwei Verfahren sind als *in-vivo*-Untersuchungen vorgestellt worden: Hasegawa et al. [58] implantierten nach Kataraktextraktion am Kaninchen ein osmotisches Pumpsystem in eine subkutane Tasche. Dieses war mit einer im Kapselsack plazierten Kanüle verbunden, so daß zyklisches RGDS-Peptid in einer konstanten Konzentration von 60 mg/ml über die Hinterkapsel abgegeben wurde. Dem Partnerauge wurde auf die gleiche Weise die reine Vehikelsubstanz zugeführt. Während am dritten postoperativen Tag kein Unterschied in der Nachstarentwicklung der beiden Gruppen zu verzeichnen war, konnte eine deutliche Migrationshemmung der LEC auf der zentralen hinteren Kapsel am siebten Tag gesehen werden (Spaltlampenuntersuchung und histologische Beurteilung nach E nukleation am siebten Tag). Keine Angaben werden über die Anzahl der untersuchten Augen und mögliche Nebenwirkungen auf andere okuläre Strukturen



gemacht.

Nishi et al. [55] implantierten fünf Kaninchen am Ende der Kataraktchirurgie Polyaktinglykolsäure-Scheiben, die entweder 4 % RGD-Peptid oder eine Kombination aus 23 % EDTA und 10 % RGD-Peptid enthielten, in den Kapselsack. Dafür wurde eine in vitro Freisetzungsrate von RGD-Peptid von 4,4 µg/h bzw. 7,6 µg/h für die kombinierte Form angegeben (Freisetzungsrate von EDTA in der kombinierten Form: 7,8 µg/h). Als Kontrollgruppe diente das jeweilige Partnerauge, das eine Polyaktinglykolsäure-Scheibe ohne RGD-Peptid bzw. EDTA erhielt. Die Nachstarbildung wurde mittels histopathologischer Aufarbeitung ein bzw. zwei Monate nach der Operation, am Tag der Tötung der Tiere, untersucht. Es zeigte sich nur ein geringer Nachstarinhibierender Effekt der RGD-Peptidgruppe gegenüber der Kontrollgruppe. Kein Unterschied zwischen beiden Gruppen fand sich auch im Endothelzellverlust. Andere okuläre Gewebe zeigten keine pathologischen Veränderungen. Bei der Kombination aus EDTA und RGD-Peptid konnten nur wenige LEC überhaupt auf der Hinterkapsel nachgewiesen werden, während ein ausgeprägter Nachstar für die Kontrollgruppe beschrieben wurde. In dieser kombinierten Gruppe bildete sich allerdings ein Endothelödem aus, mikroskopisch war aber kein Endothelzellverlust sichtbar. Iris und Ziliarkörper waren mit Entzündungszellen infiltriert. An der Retina sah man keine pathologischen Veränderungen. Zu diesen Ergebnissen muß kritisch angemerkt werden, daß nicht genau angegeben wird, wieviel Augen bzw. Tiere pro Gruppe untersucht wurden. Die Zahl von fünf Kaninchen ist aber sicher als recht klein zu bewerten. Außerdem wird nicht offengelegt, welche Tiere nach einem Monat und welche nach zwei Monaten untersucht wurden und wieso es überhaupt zwei verschiedene Zeitpunkte der Beendigung des Versuches gab. Auch ist eine Aussage über eine Steigerung des Nachstarinhibierenden Effektes des RGD-Peptides bei Anwesenheit von EDTA nicht möglich, da die kombinierten Scheiben die 2,7fache Menge an RGD-Peptid enthielten (1,5 mg bzw. 4,0 mg).

Neben den angeführten noch offenen Fragen und Kritikpunkten werden einige Probleme bezüglich der klinischen Umsetzung offenbar: Die von Nishi [55] implantierten Scheiben haben ein ebenso hohes Gewicht wie die für die optische Rehabilitation erforderlichen Intraokularlinsen (IOL). Dadurch ist mit einer recht großen Belastung der Linsenkapsel sowohl durch das erhöhte intrakapsuläre Volumen als auch durch das verdoppelte Gewicht zu rechnen. Es besteht also die Gefahr, daß es zu einer Subluxation oder Luxation bzw. Ruptur der Linsenkapsel mit IOL kommt. Auch kann die opti-

sche Klarheit der IOL durch die RGD-Peptid-Tägerscheibe beeinträchtigt sein. Das von Hasegawa [58] vorgestellte Prinzip der kontinuierlichen Abgabe von zyklischem RGDS-Peptid in den Kapselsack erfordert eine länger bestehende Bulbusöffnung. So ist ein Eindringen von pathogenen Keimen in das Auge zu befürchten. Es ist außerdem von einem zusätzlichen Spülmechanismus durch das Besprühen der Hinterkapsel mit RGD-Peptid auszugehen – ein zusätzlicher mechanischer Inhibitor der Zelladhäsion.

Die Untersuchungen von Nishi und Hasegawa gehen davon aus, daß eine nur kurzzeitige Inkubation mit RGD-Peptid keinen ausreichenden und dauerhaften Effekt auf die Inhibition von Adhäsion, Migration und Proliferation der LEC haben würde. Untersucht wurde dies bisher jedoch nicht. Daß eine systemische Applikation des RGD-Peptids sicher keinen Nachstarinhibierenden Effekt, aber Nebenwirkungen (z.B. eine Koagulopathie) bewirken würde, wurde bereits beschrieben (s. 1.6.2.). Bei den erwähnten Nachteilen und der sehr aufwendigen Durchführung einer verzögerten Freisetzung des Peptids würde beispielsweise das Zufügen von RGD-Peptid zur Spüllösung für die Katarakt-Operation jedoch eine viel einfachere praktische Handhabung und kostengünstigere Alternative zur Nachstarprävention darstellen.

Nach einer **einstündigen Inkubation boviner LEC** mit dem von uns verwendeten RGD-Peptid cRGD<sub>D</sub>FV in einer Konzentration von  $10^{-4}$  M betrug die Hemmung der Adhäsion bzw. Proliferation nach sieben Tagen 48,5 %. Durch eine Verzehnfachung der Peptid-Konzentration konnte die Adhäsions-/ Proliferations-Hemmung nicht erhöht werden (41,9 % Adhäsion am siebten Tag) (s.a. 4.1.2. und 4.2.). Die Zellen bildeten bereits am fünften Tag des Experimentes einen konfluenten Rasen im Well der Kulturschale, so daß die eigentlich recht hohe inhibitorische Wirkung des Peptids als nicht ausreichend angesehen werden muß. **Humane LEC** zeigten nach einstündiger Inkubation mit cRGD<sub>D</sub>FV in einer Konzentration von  $10^{-3}$  M eine 100%ige Hemmung der Adhäsion – nach einer Stunde ebenso wie am siebten Tag des Experiments – (s. 4.1.2. und 4.2.). Wie beschrieben, war es zu keiner Proliferation der Zellen der Kontrollgruppe innerhalb dieser einen Woche gekommen. So ist zumindest für die Adhäsion humaner LEC auf dem Boden der Kulturschale von einem ausreichenden Effekt auf die Hemmung derselben durch cRGD<sub>D</sub>FV ( $10^{-3}$  M) auszugehen. Eine Schlußfolgerung, ob auf diese Weise eine Nachstarprävention gelingt, ist jedoch nicht möglich, da auch wir keine Aussage über die Hemmung der Proliferation treffen konnten. Hier werden tierexperimentelle Untersuchungen unerlässlich sein.

Nach einstündiger Inkubation mit cRGD<sub>D</sub>FV der Konzentration  $10^{-3}$  M wurde bei bovi-

nen LEC ein statistisch signifikanter Unterschied zwischen der Kontrollgruppe und der Kontrollpeptid-Gruppe festgestellt. So ist zu vermuten, daß das Kontrollpeptid in dieser hohen Konzentration auch ohne funktionelle RGD-Sequenz die Zelladhäsion boviner LEC hemmt. Die Aussage über die adhäsionsinhibierende Potenz des von uns verwendeten cRGD<sub>D</sub>FV ist daher in diesem Fall nur eingeschränkt möglich, da sich hier möglicherweise die Effekte der Trägersubstanz und der RGD-Sequenz addieren. Es könnte sich aber auch um einen zufälligen Effekt handeln, der z.B. auf einen Fehler in der Versuchsdurchführung zurückzuführen ist, da ein gleicher Versuchsansatz mit humanen LEC keinen statistisch signifikanten Unterschied zwischen Kontrollgruppe und Kontrollpeptid-Gruppe zeigte. Ein Effekt, der ausschließlich durch die RGD-Sequenz hervorgerufen wird, liegt bei statistisch signifikantem Unterschied zwischen Kontrollpeptid- und cRGD<sub>D</sub>FV-Gruppe des Experimentes mit bovinen LEC aber sicher vor.

**Zusammenfassend** ist bezüglich **der hier vorgestellten Experimente zur Langzeit- bzw. Kurzzeit-Inkubation boviner und humaner LEC** festzustellen, daß eine Hemmung der Adhäsion der LEC mittels des von uns verwendeten cRGD<sub>D</sub>FV auf dem Boden der Kulturschale sehr gut bis vollständig möglich ist. Die Zellen adhärieren vorwiegend unter Vermittlung von Vitronektin, welches reichlich im bovinen Serum des Kulturmediums vorhanden ist [82], nur gering via Fibronektin. Vitronektin ist kein nachgewiesener Bestandteil von Linsenkapseln. Eine stark adhäsionshemmende Wirkung an diesem Liganden durch RGD-Peptide ist bereits durch mehrere Arbeitsgruppen beschrieben worden [72], [73] (s. auch 1.6.1.). Auch ist bekannt, daß humane LEC in Langzeit-Kulturen (nach 450 Tagen) in der Lage sind, selbst Linsenkapsel-Proteine zu synthetisieren (Laminin und Kollagen IV) [60]. Wann diese Synthese einsetzt, ist nicht bekannt. Möglicherweise sind Laminin und Kollagen IV schon früher Adhäsionsgrundlage für Zellen in Zellkultur. Die sehr hohe Adhäsionshemmung auf Kulturschalen mittels cRGD<sub>D</sub>FV läßt jedoch nicht vermuten, daß dies schon im Verlaufe unserer Experimente der Fall ist.

Es ist als ein besonders interessantes Ergebnis hervorzuheben, daß die Hemmung der Adhäsion/Proliferation der bovinen LEC bei fünftägiger Einwirkung von cRGD<sub>D</sub>FV ( $10^{-4}$  M) ausgeprägter ausfiel als die der humanen LEC, wohingegen die Kurzzeit-Inkubation mit cRGD<sub>D</sub>FV der Konzentration  $10^{-3}$  M zum völligen Adhäsionsverlust der humanen LEC bis zum siebten Tag führte, die bovinen LEC aber keine ausreichende Hemmung der Proliferation erfuhren. Es wäre möglich, daß für humane LEC eine



cRGD<sub>D</sub>FV -Konzentration von  $10^{-3}$  M bereits ausreicht, um die Apoptose derselben einzuleiten (entsprechend den Untersuchungen von Buckley et al. [74]). Der nahezu vollständige Hemmeffekt auf die Adhäsion der Zellen nach nur einstündiger Inkubation macht sehr wahrscheinlich, daß es in diesem kurzen Zeitraum zur Apoptose der Zellen gekommen ist. Dann wäre die Aktivierung von Pro-Caspase-3 der bovinen LEC erst durch höhere Peptidkonzentrationen auslösbar bzw. ausgeprägter.

Unterschiede in der Expression von Integrinen boviner und humaner LEC sind nicht bekannt.

### **5.1.2. Untersuchungen zu Adhäsion und Proliferation der LEC auf exzidierten bovinen Vorderkapseln**

Um eine Annäherung an die physiologischen Gegebenheiten zu erreichen, untersuchten wir nun die Wirkungen unseres zyklischen RGD-Peptids cRGD<sub>D</sub>FV auf die Adhäsion auf bovinen Linsen-Vorderkapseln.

Voruntersuchungen an Linsenkapseln bzw. an einzelnen Komponenten von diesen hatten gezeigt, daß eine Hemmung der Adhäsion, Migration bzw. Proliferation von LEC durch RGD-Peptide an diesen Liganden möglich ist:

Palmade [56] fand unter Anwesenheit von *extrazellulärer Matrix* (Zellsuspension) eine Adhäsion von rund 20 % nach einstündiger Inkubation mit  $10^{-3}$  M eines als LCM 1910 bezeichneten RGD-Peptids (keine näheren Angaben) gegenüber ca. 28 % ohne Zugabe von RGD-Peptid (die Prozentangaben beziehen sich jeweils auf 100 % eingesäte Zellen). Auf *bovinen Vorderkapseln* waren nach einer Stunde und bei einer Peptid-Konzentration von  $10^{-3}$  M rund 30 % der Zellen adhärent (gegenüber rund 35 % bei einer Peptidkonzentration von  $10^{-3}$  M). Alle diese Untersuchungen wurden an **bovinen** LEC und Kapseln durchgeführt.

Oharazawa [57] beschreibt bei **humanen** LEC, die mit large-T-Antigen von SV 40 transfiziert worden waren, eine Adhäsionshemmung auf Fibronectin von 80 % unter Verwendung von 2 mg/ml des verwendeten RGD-Peptids (keine näheren Angaben) nach drei Stunden. Zum gleichen Zeitpunkt und bei gleicher Peptidkonzentration waren auf Laminin erste adhäsionshemmende Effekte zu verzeichnen. Wie ausgeprägt diese waren, ist nicht angegeben. Auf Kollagen waren schließlich, unabhängig von der Peptidkonzentration, keine Auswirkungen auf die Adhäsionsrate der Zellen zu erkennen.

Eine Proliferationshemmung der LEC auf Linsen kapseln **in vivo (Kaninchen-Modell)** wurde in den unter 5.1.1. aufgeführten Experimenten der Gruppen um Nishi und Hasegawa [58], [55] nachgewiesen.

In unseren Experimenten zeigte sich, daß sowohl humane als auch bovine LEC durch hohe Konzentrationen an cRGD<sub>D</sub>FV ( $10^{-3}$  M) nicht an einer Adhäsion auf den Kapseln gehindert wurden. Ein Unterschied in der Dichte des Zellrasens der Kontrollpeptid-Gruppe bzw. der cRGD<sub>D</sub>FV-Gruppe war zu keinem Zeitpunkt lichtmikroskopisch feststellbar.

Die von Palmade et al. [56] gezeigten adhäsionsinhibierenden Effekte des RGD-Peptids LCM 1910 auf extrazellulärer Matrix bzw. Linsen kapseln sind nur sehr gering ausgeprägt. Ob sie im Vergleich mit einer Kontrollgruppe statistisch signifikant wären, ist fraglich und durch die Autoren nicht untersucht. Außerdem wurde hier die Zellzahl lediglich eine Stunde nach Zugabe der Zellen und des RGD-Peptids ermittelt. Da die Adhäsionshemmung nicht vollständig war, ist es möglich, daß die verbliebenen adhären-ten Zellen im weiteren Verlauf dennoch migrieren und proliferieren und so der anfängliche Hemm-Effekt verkleinert oder aufgehoben würde.

Auch die von Oharazawa vorgestellten Ergebnisse an humanen LEC [57] sprechen nicht für eine adhäsionshemmende Potenz des RGD-Peptids auf Kapseln, da Fibronectin kein nachgewiesener Bestandteil von adulten humanen Linsen kapseln ist. Die Aussage, daß ein erster adhäsionshemmender Effekt auf Laminin verzeichnet wurde, ist ob ihrer Ungenauigkeit kaum zu deuten. Laminin wird in einer anderen Arbeit von Oharazawa et al. [83] als wichtigstes Adhäsionssubstrat für humane LEC beschrieben (im Vergleich mit Kollagen IV und Fibronectin). Olivero et al. [68] jedoch kommen bei Untersuchungen an LEC des Kaninchens zu der Schlußfolgerung, daß die Adhäsion der Zellen v.a. durch Kollagen IV (welches aber RGD-unabhängig mit den Integrinen der Zelle interagiert [68], [76]) und viel weniger durch Laminin und Fibronectin bedingt ist. Die Migration hingegen sei vorwiegend auf Fibronectin zurückzuführen und viel weniger auf Kollagen IV und Laminin [68]. Die Langzeituntersuchungen von Nishi [55] und Hasegawa [58] beschreiben einen qualitativ hemmenden Einfluß auf die Nachstarbildung im Tierexperiment. Dieser war bei einer verzögerten Freisetzung von RGD-Peptid aus der Polyaktinglykolsäure-Scheibe sehr gering. Die Steigerung des Effektes durch Erhöhung der Peptid-Konzentration und Zugabe von EDTA führte dann zu einem den Nachstar hemmenden Effekt und auch zu intraokularen Nebenwirkungen, die ihren klini-

schen Einsatz sehr beschränken. Auf welchen der beiden Faktoren (RGD-Peptid oder EDTA) diese zurückzuführen sind, ist nicht zu schlußfolgern, da die Konzentration beider Substanzen gegenüber der reinen RGD-Scheibe variiert wurde. Über die sehr kleine Anzahl untersuchter Augen, die rein qualitativ erfaßte Wirkung des RGD-Peptids und die mögliche optische Beeinträchtigung durch die zusätzlich implantierten Scheiben sind bereits kritische Anmerkungen gemacht worden (s. 5.1.1.). Ebenso wurde über die sich ergebenden offenen Fragen und Kritikpunkte der Untersuchung von Hasegawa et al. [58] berichtet (s. 5.1.1.).

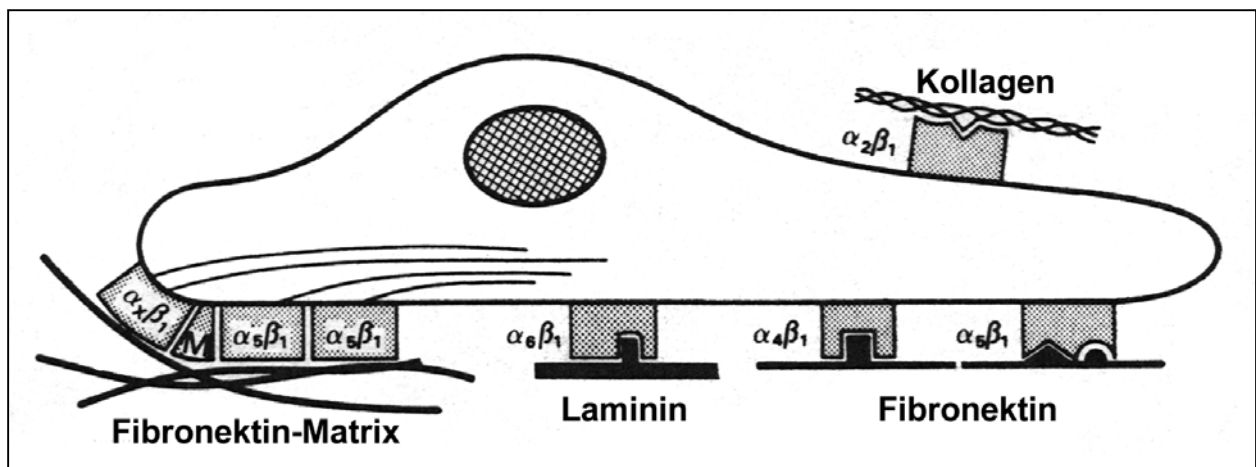
### **5.1.3. Untersuchungen zur Ablösung der LEC**

Da die **Ablösung** sowohl der bovinen als auch der humanen LEC **vom Boden der Kulturschale** unter schon sehr geringen Konzentrationen an cRGD<sub>D</sub>FV ( $10^{-4}$  M) gelang und diese bereits nach rund 30 Minuten komplett war, ist von einer recht schwachen Adhäsion der LEC an der Kulturschale auszugehen. Wie unter 5.1.1. beschrieben, haften die Zellen wahrscheinlich überwiegend über Vitronektin am Boden. Ob die Zellen bereits selbst Kollagen IV bzw. Laminin synthetisiert hatten, scheint fraglich, denn beschrieben ist dies bisher nur nach einem Zeitraum von 450 Tagen [60]. Der Untersuchung von Heyman et al. zufolge [76] ist dies dennoch nicht auszuschließen, denn hier konnte gezeigt werden, daß auch Zellen, die ohne Zugabe von Serum kultiviert wurden, nach 24 Stunden Adhärenz durch die Zugabe von RGD-Peptid ablösbar waren. Die Autoren gehen davon aus, daß sich zu diesem Zeitpunkt keine Adhäsion über Vitronektin, sondern ausschließlich über durch die Zellen sezerniertes Fibronektin gebildet hatte. Eine Aufnahme zusätzlicher Zell-Ligand-Beziehungen scheint mangels anderer potentieller Liganden in diesem Modell nicht möglich, so daß ein Ablösen der Zellen durch kompetitive Hemmung der Integrine oder eine Induktion der Apoptose erfolgt. Im Gegensatz zu Buckley et al. [74] gehen Heyman et al. [76] nicht von einem toxischen Effekt des RGD-Peptids aus, da nach der Ablösung der Zellen eine Anfärbung mit Trypan-Blau nicht gelang. Auch waren die Zellen nach einem gründlichen Waschvorgang erneut zur Adhäsion fähig und hatten ihre ursprüngliche Morphologie behalten.

Sind LEC aber auf der **bovinen Linsen kapsel** adhären, so ist davon auszugehen, daß mehr als nur Integrin-RGD-Interaktionen diese Adhäsion aufrechterhalten [76]. Zu nennen sind hier weitere Adhäsionsmoleküle wie CD-44 sowie ICAM-1 [18], welche ebenfalls RGD-unabhängig sind. Auch binden LEC z.B. an das Kollagen IV der Linsen kapsel; diese Bindung ist RGD-unabhängig. Aber auch die  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängigen Zell-Zell-

Verbindungen mittels Cadherinen spielen eine Rolle für die Stabilität der Zell-Adhäsion und das Überleben der Zellen [84]. Die Adhäsion durch Erkennen einer RGD-Sequenz ist nur *ein* Teil einer Reihe von Mechanismen der LEC, Verbindungen mit extrazellulärer Matrix einzugehen und aufrechtzuerhalten. Ein Beispiel für die Vielfalt von Adhäsionsmechanismen allein durch Integrine der Zelle mit unterschiedlicher extrazellulärer Matrix zeigt Abb. 5.1.

Auch ist die Bindung des zugefügten löslichen RGD-Peptids an eine Zelle kompetitiv zu der Bindung der Zelle an extrazelluläre Matrix. Liegen also mehr Liganden dieser Matrix als zugefügte synthetische RGD-Sequenzen vor, ist keine Hemmung der Integrin-RGD-vermittelten Zelladhäsion möglich. Sind die Adhäsionsmoleküle der LEC mit den Liganden der extrazellulären Matrix der Linsenkapsel Verbindungen eingegangen, dann sind diese durch das Zufügen löslicher RGD-Peptide nicht mehr zu unterbrechen. Auch eine Ablösung der humanen LEC von den intraoperativ gewonnenen **humanen Linsen-Vorderkapseln** durch eine 48-stündige Inkubation mit cRGD<sub>D</sub>FV war nicht zu erzielen.



**Abb. 5.1.:** Schematisches Modell verschiedener Zell-Interaktionen mit extrazellulären Glykoproteinen mittels spezifischer Erkennungssequenzen. Zellen können Integrin-Rezeptoren (wie dargestellt) oder andere Arten von Rezeptoren zur Interaktion mit spezifischen Peptid-Regionen von Liganden benutzen. **Integrin-Rezeptoren** bestehen aus Heterodimeren mit einer  $\alpha$ - und einer  $\beta$ -Untereinheit, jede Untereinheit kann eine Liganden-Spezifität determinieren. Einige der Zell-Adhäsions-Liganden, wie z.B. Fibronektin, können viele verschiedene Bindungsstellen haben, die wiederum von vielen verschiedenen Integrinen erkannt werden (nach Yamada [67]).

Der Vergleich zweier aus den Augen eines **Organspenders** entnommener Kapselsäcke mit implantierter Intraokularlinse zeigte allein durch die Inkubation mit cRGD<sub>D</sub>FV sehr geringer Konzentration ( $10^{-4}$  M) eine Veränderung der Nachstarzellen:

sie verloren an Vitalität (Vergrößerung der Zellen mit reichlich Vakuolen im Zellplasma). Auch waren bereits zellfreie Areale entstanden. Durch das Spülen der Kapselsäcke unter Druck gelang schon nach wenigen Minuten das Ablösen großer Zellmengen, in der Kontrollgruppe war dies nicht der Fall. Wir konnten pro Gruppe lediglich ein Nachstarpräparat untersuchen, so daß Schlußfolgerungen nicht gezogen werden können, zumal die explantierten Kapselsäcke mit IOL keinen gleich stark ausgeprägten Nachstar aufwiesen. Es kann höchstens von einem ermutigenden Fallbeispiel gesprochen werden. Eine mögliche Erklärung der Beobachtungen ist, daß die bereits zu Blasenzellen transformierten LEC leichter durch cRGD<sub>D</sub>FV ablösbar sind oder direkt die Apoptose der Zellen durch cRGD<sub>D</sub>FV eingeleitet wird. Für die Nachstarprävention wäre dieser Effekt allerdings nicht ausreichend, ein Einsatz von cRGD<sub>D</sub>FV zur operativen Nachstarabsaugung jedoch – cRGD<sub>D</sub>FV als Zusatz zur Spülflüssigkeit – wäre denkbar. Es sind aber zunächst noch weitere Untersuchungen an explantierten humanen Nachstarpräparaten und in vivo erforderlich.

#### ***5.1.4. Untersuchungen zur Wirkung von cRGD<sub>D</sub>FV auf das Hornhautendothel***

Konfluente bovine Hornhautendothelzell-Layer waren, anders als die Linsenepithelzell-Layer, durch eine Inkubation mit cRGD<sub>D</sub>FV nicht vollständig vom Boden der Kulturschale ablösbar. Es bildeten sich allerdings alveolenartige Löcher im Zellrasen, so daß wir von einer Ablösung eines Teils der Endothelzellen ausgehen müssen. Wurden jedoch intakte humane Hornhäute mit cRGD<sub>D</sub>FV inkubiert, war auch nach mehreren Tagen keine Zunahme avitaler Zellen (sowohl Epithel- als auch Endothelzellen) bzw. keine Ablösung von Endothelzellen der Hornhaut zu verzeichnen.

Diese Ergebnisse stimmen mit denen der in-vivo-Untersuchungen von Nishi [55] überein, die keinen Hornhautendothelzellverlust nach Implantation von RGD-Peptid-haltigen Scheiben in den Kapselsack beschreiben. Daß sich in dieser Studie in der kombinierten Gruppe (RGD-Peptid- und EDTA-haltige Scheiben) ein Endothelödem entwickelte, läßt sich auf die Funktion von EDTA als Ca<sup>2+</sup>-Chelat-Bildner zurückführen: Auf diese Weise werden interzelluläre Verbindungen durch Cadherine unterbrochen, und Kammerwasser kann leichter in die Interzellularspalten eindringen.

In der Untersuchung von Heyman et al. [76] wird berichtet, daß auch Endothelzellen durch RGD-Peptid-Zugabe von ihrer Adhäsionsfläche zu lösen waren, genaue Angaben werden jedoch nicht gemacht, so daß ein Vergleich mit unseren Ergebnissen nicht möglich ist.

Die bezüglich der Ablösung vom Boden der Kulturschale durch cRGD<sub>D</sub>FV bestehenden Unterschiede zwischen Hornhaut-Endothel- und Linsen-Epithel-Zellen könnten durch unterschiedliche Adhäsionsmechanismen in vitro erklärt werden. Sowohl über die Adhäsion der Hornhaut-Endothelzellen an der Basalmembran in vitro als auch in vivo ist bisher nichts bekannt. Ob Integrine daran beteiligt sind und wenn ja welche, wird noch zu untersuchen sein.

## 5.2. Fehleranalyse

### 5.2.1. Untersuchungen zur Adhäsion der LEC auf dem Boden der Kulturschale

Eine Aussage über den Einfluß des zyklischen RGD-Peptids cRGD<sub>D</sub>FV auf die **Proliferation humaner LEC** konnten wir nicht treffen, da nach siebentägiger Versuchsdauer erst rund 20-30 % der Zellen der Kontroll- bzw. Kontrollpeptid-Gruppe adhärent waren. Eine längere Versuchsdauer – bis zum Einsetzen der Proliferation der LEC in der Kontrollpeptid- und Kontrollgruppe – wurde nicht gewählt, da die nötigen Wechsel des Kulturmediums jeweils ein Rückzentrifugieren der noch nicht adhärenen LEC erforderlich gemacht hätte. Dadurch war ein Vitalitätsverlust von Zellen zu erwarten. Auch wollten wir keine größere Anzahl humaner LEC pro Well der Kulturschale aussäen, da dann der Vergleich der Wirkung von cRGD<sub>D</sub>FV auf bovine bzw. humane LEC unter der gleichen Peptidkonzentration schwierig gewesen wäre (es wurde die gleiche Anzahl humaner bzw. boviner LEC/cm<sup>2</sup> Well ausgesät). Eine längere Durchführung des Experimentes hielten wir nicht für sinnvoll, da alle Zellen der cRGD<sub>D</sub>FV-Gruppe über sieben Tage nicht adhärent gewesen waren. Es war daher mit einem Zelltod dieser Zellen zu rechnen, durch Anoikis oder direkt durch eine durch das cRGD<sub>D</sub>FV ausgelöste Apoptose. Buckley et al. [74] berichten vom Tod von 50 % nicht adhärenter Zellen (T-Lymphozyten) innerhalb der ersten 24 Stunden unter RGD-Peptid (keine näheren Angaben) 10<sup>-4</sup> bzw. 10<sup>-3</sup> M. Ein Vergleich der Kontrollpeptid- bzw. cRGD<sub>D</sub>FV-Gruppe wäre somit nach mehr als sieben Tagen nicht mehr sinnvoll gewesen.

### 5.2.2. Untersuchungen zur Adhäsion der LEC auf Linsenkapseln

Wir untersuchten die Adhäsion/Proliferation humaner und boviner LEC ausschließlich auf **bovinen Linsenkapseln**. Es ist möglich, daß Unterschiede im Aufbau humaner und boviner Kapseln bestehen, die auch einen Einfluß auf unsere Untersuchungen haben. Für humane Linsenkapseln ist das Vorhandensein von Laminin und Kollagen I, III

und IV beschrieben [2], für bovine Kapseln waren dies v.a. Kollagen IV und Entactin [3]. Gefunden wurde dort auch ein kleiner Anteil an Laminin, Heparansulfat und Fibronectin. Da nach den jeweils nicht nachgewiesenen Proteinen nicht gesucht wurde, kann die Ähnlichkeit beider Kapseln noch größer sein.

Eine mögliche Ungenauigkeit in unseren Experimenten kann dadurch entstanden sein, daß sich die eingesäten Zellen der Kontrollpeptid- und Kontrollgruppe sowohl auf der Kapsel als auch auf dem die Kapsel umgebenden Boden der Kulturschale anhefteten, während es in der cRGD<sub>D</sub>FV-Gruppe zu keiner Adhäsion auf dem Boden der Kulturschale kam, so daß alle eingesäten Zellen auf der Kapsel adhärirten.

So befanden sich in der cRGD<sub>D</sub>FV-Gruppe mehr Zellen auf einer Kapsel als in der Kontrollpeptid- und Kontrollgruppe. Es ist vorstellbar, daß durch die große Anzahl der LEC die eigentlich sehr hohe cRGD<sub>D</sub>FV-Konzentration nicht ausreichend war für die große Anzahl zu besetzender Integrinrezeptoren. Geht man von einem Auslösen der Apoptosis durch RGD-Peptide aus, könnte die dafür notwendige Konzentration unterschritten gewesen sein, bzw. in nur verhältnismäßig wenigen Zellen eine Apoptose induziert haben. Ein Vergleich dieser Werte mit den Daten der Arbeitsgruppe um Palmade [56] ist leider nicht möglich, da ihrer Veröffentlichung nicht zu entnehmen ist wie hoch die Zellzahl pro mm<sup>2</sup> Linsen kapsel war.

### **5.2.3. Untersuchungen zur Ablösung der LEC**

Zur Untersuchung der Ablösung humaner LEC von **humanen Linsen-Vorderkapseln** bestanden die Gruppen aus einer recht kleinen Anzahl von Präparaten (cRGD<sub>D</sub>FV 24 Stunden 10<sup>-4</sup> M: 12 Präparate bzw. 17 Präparate der Kontrollgruppe) (cRGD<sub>D</sub>FV 48 Stunden 2x10<sup>-3</sup> M: je acht Präparate beider Gruppen). Obwohl dem bei der statistischen Auswertung Rechnung getragen wurde, ist diese Zahl sicher als recht gering anzusehen. Noch mehr fällt dies ins Gewicht bei der Untersuchung der Intraokularlinsen im Kapselsack eines **Organspenders**; sie stellt lediglich ein Fallbeispiel dar. Aus ethischen Gründen konnten hier nur die Augen Verwendung finden, deren Hornhäute nicht für eine Organtransplantation geeignet waren.

### **5.2.4. Untersuchungen zur Wirkung von cRGD<sub>D</sub>FV auf das Hornhautendothel**

Von den zwei untersuchten humanen Hornhäuten wurde diejenige mit cRGD<sub>D</sub>FV inkubiert, die direkt nach der Präparation verwendet wurde, also als „frischer“ als die bereits fünf Wochen kultivierte Hornhaut angesehen werden muß. Da jedoch neben dem Un-

terschied zwischen den beiden Hornhäuten auch der Zustand vor und nach der Inkubation mit Kontrollmedium bzw. cRGD<sub>D</sub>FV verglichen wurde, ist dies zu vernachlässigen. Wie unter 5.2.3. beschrieben, ist die Anzahl untersuchter Hornhäute als recht klein anzusehen und das Ergebnis stellt lediglich ein Fallbeispiel dar.

### **5.3. Schlußfolgerung**

Zusammenfassend lassen unsere Untersuchungen zur Wirkung des zyklischen RGD-Peptids cRGD<sub>D</sub>FV auf Adhäsion und Proliferation der LEC auf bovinen Linsenkapiteln vermuten, daß ein hemmender Einfluß durch dieses Peptid nicht oder nur in geringem Maße möglich ist, während die Hemmung auf dem Boden der Kulturschale auch nach nur kurzzeitiger Inkubation gelingt. Es ist jedoch nicht ausgeschlossen, daß durch höhere Konzentrationen an cRGD<sub>D</sub>FV eine zur Nachstar-Inhibition ausreichende Adhäsionshemmung der LEC auf Kapiteln zu erreichen ist. Käme es dann zu einer vermehrten Adhäsionshemmung der Zellen, spräche dies vor allem für die Theorie der Induktion der Apoptose der LEC [74] durch RGD-Peptide, da wie erwähnt RGD-abhängige Integrin-Ligand-Interaktionen auf der Linsenkapitel nur in sehr geringem Maße für die Adhäsion (Laminin und Fibronektin) und stärker für die Migration (Fibronektin) der LEC verantwortlich sind [68]. Da die Untersuchungen von Nishi [55] und Hasegawa [58] eine Hemmung der Nachstarbildung durch langdauernde Einwirkung von RGD-Peptid beschreiben, werden weitere tierexperimentelle Studien zur Überprüfung dieses Effektes erforderlich sein – unter Beachtung der erwähnten Kritikpunkte.

Das Lösen bereits bestehender Adhäsionen von humanen LEC auf humanen Linsenkapiteln gelang in unseren Untersuchungen nicht, ebenso waren die Adhäsionen auf bovinen Kapiteln durch cRGD<sub>D</sub>FV nicht zu unterbrechen. Es erwies sich jedoch die druckvolle Spülung des Kapittelsackes mit cRGD<sub>D</sub>FV als erfolgreich beim Lösen von Nachstarzellen aus dem Kapittelsack bzw. von der in diesen implantierten IOL eines Organspenders. Es wird tierexperimentell zu untersuchen sein, ob diese erleichterte Ablösung der LEC vom Kapittelsack auch unter in-vivo-Bedingungen zu erreichen ist.

Diese ermutigenden Ergebnisse bezüglich einer erleichterten Ablösung transformierter LEC von der Linsenkapitel bzw. der IOL werden auch nicht durch eine Endotheltoxizität des cRGD<sub>D</sub>FV in Frage gestellt. Das Endothel intakter humaner Hornhäute wies keinen vermehrten Zellverlust auf.



## **6. Zusammenfassung**

### **6.1. Problemstellung**

Die Entwicklung eines Nachstars ist eine der Hauptursachen für einen Visusabfall nach erfolgreicher Kataraktoperation. Dabei kommt es zur Adhäsion, Migration und Proliferation verbliebener Linsenepithelzellen (LEC) auf der Linsenkapsel und somit zur Trübung der optischen Achse. Die Inzidenz des Nachstars wird mit 10-50 % [6], [7] angegeben. Trotz verbesserter Operationsverfahren, verschiedenster Variationen des Designs und/oder Materials der Intraokularlinsen (IOL) und Untersuchungen unter Anwendung von immunologischen und pharmazeutischen Agentien ist eine Prävention des Nachstars bisher nicht möglich. Zur visuellen Rehabilitation stehen zwei Verfahren zur Verfügung: die YAG-Kapsulotomie und die chirurgische Nachstar-Absaugung. Beide bergen Risiken, wie das Entwickeln einer Ablatio retinae, eines zystoiden Makulaödems oder – bei chirurgischem Vorgehen – einer Endophthalmitis. Auch sind mit diesen Behandlungsmethoden erhebliche Kosten verbunden.

### **6.2. Mechanismen der Entstehung eines Nachstars und deren Beeinflussung durch RGD-Peptide**

Eine Nachstarmembran entsteht durch Adhäsion, Migration und späterer Proliferation und Differenzierung der LEC auf der Linsenkapsel. Ermöglicht und stabilisiert wird dies durch Zell-Zell-Interaktionen und Zell-Matrix-Verbindungen. Die Linsenkapsel, als extrazelluläre Matrix, enthält Adhäsionsproteine wie Kollagen und Laminin. An diesen können die Adhäsionsmoleküle der LEC anheften. Neben ICAM-1 und CD-44 [18] spielen hier insbesondere die Integrine eine bedeutende Rolle. Viele Subtypen aus der Gruppe der Integrine binden auf der Seite der extrazellulären Matrix an eine bestimmte Aminosäuren-Sequenz: Arginin-Glyzin-Asparagin, kurz „RGD“ genannt. Diese hat sich als unabdingbar für das Zustandekommen von Zelladhäsionen einer Reihe von Zelltypen und Adhäsionsproteinen erwiesen [71], [70]. Durch Zugabe von synthetisch hergestelltem RGD-Peptid konnte dann die Adhäsion verschiedenster Zellen an Laminin, Fibronectin und Vitronectin kompetitiv gehemmt werden [73], [71], [81], [85]. So wurde die Wirkung dieser Peptide auch auf die Adhäsion von LEC und somit auf die Nachstarbildung un-

tersucht. In vitro konnten Palmade et al. [56] einen inhibitorischen Einfluß des Peptids auf die Adhäsion auf bovinen Linsenkapseln zeigen. In vivo ist durch den hohen Kammerwasser-Turnover mit einem Wirkverlust des Peptids bei lokaler intraokularer Applikation zu rechnen. Systemisch (oral oder intravenös) wäre mit schweren Nebenwirkungen, wie z.B. einer Koagulopathie [75] zu rechnen. Die daher durchgeführten Versuche zur kontinuierlichen Freisetzung des RGD-Peptids im Auge [55], [58] sind jedoch aufgrund bestimmter Risiken nicht auf die klinische Anwendung zu übertragen.

### **6.3. Zielstellung**

Es war deshalb zu untersuchen, ob durch eine Kurzzeit-Inkubation mit dem von uns verwendeten zyklischen RGD-Peptid cRGD $\Delta$ FV eine ausreichende Hemmung der Adhäsion der LEC zu erzielen ist. Außerdem überprüften wir, ob mittels cRGD $\Delta$ FV auch eine Ablösung bereits adhärenter LEC gelingt. Unter der Vorstellung, cRGD $\Delta$ FV der Spüllösung für die Katarakt-Operation zuzusetzen, wären so nicht nur abgelöste Zellen an einer erneuten Adhäsion zu hindern, sondern es wäre dann auch u.U. möglich, die Kapsel vollständig von LEC zu säubern. Desweiteren war ein Vergleich der Nachstar-hemmenden Potenz unseres RGD-Peptids mit den Peptiden der vorausgegangenen Arbeiten und eine Prüfung einer eventuellen Toxizität auf das Hornhautendothel angestrebt.

### **6.4. Material und Methoden**

Verwendet wurden sowohl bovine als auch humane Linsenepithelzellkulturen, bovine Hornhautendothelzellkulturen, präparierte humane Hornhäute sowie explantierte Kapselsäcke humaner Spender. Sowohl zur Untersuchung der Adhäsionshemmung als auch der Ablösung adhärenter Zellen wurden unterschiedliche Inkubationszeiten und Konzentrationen von cRGD $\Delta$ FV verwendet. Als Kontrolle diente ein Kontrollpeptid nahezu gleichen Molekulargewichtes ohne die RGD-Sequenz. Zur Sichtbarmachung avitaler Zellen verwendete man Trypan-Blau. Die Experimente wurden fotodokumentiert, bzw. es erfolgte eine Auszählung der Anzahl adhärenter Zellen. Zur statistischen Auswertung wurde der ANOVA-Rangsummen-Test nach Friedman bzw. Fischers Exakter Test eingesetzt.

## 6.5. Ergebnisse

Während eine Hemmung der Adhäsion (69-100 % Hemmung) bzw. eine vollständige Lösung adhärenter LEC vom Boden der Kulturschale schon mit sehr geringen Konzentrationen an cRGD $\beta$ FV ( $10^{-4}$  M) gelang, blieben beide Vorgänge auf Linsenkapseln unbeeinflussbar. Die Experimente zur Adhäsion auf dem Boden der Kulturschale zeigten eine bei gleicher Konzentration größere Potenz unseres RGD-Peptids im Vergleich zu dem der Gruppe um Palmade [56].

Nach dreitägiger Inkubation mit cRGD $\beta$ FV ( $10^{-4}$  M) gelang es, die Nachstarmasse aus einer explantierten humanen Kapsel unter Spül Druck zu lösen.

Unter Einwirkung von cRGD $\beta$ FV entstanden Defekte im konfluenten Zellrasen boviner Hornhautendothelzellen in der Kulturschale, während präparierte humane Hornhäute keine Zunahme avitaler Zellen aufwiesen.

## 6.6. Diskussion

Zusammenfassend kann gesagt werden, daß die vorgestellten Ergebnisse nicht zu weiteren in-vivo-Studien ermutigen, da keine ausreichende Adhäsionshemmung boviner und humaner LEC auf Linsenkapseln zu erzielen war. Erklärbar ist dies durch die Vielzahl weiterer Adhäsionsmechanismen: mittels RGD-unabhängiger Integrine und Integrin-unabhängiger Adhäsionen. Auf dem Boden der Kulturschale sind hingegen nur wenige Adhäsionsmechanismen wirksam, die durch RGD-Peptid ausgesprochen gut zu beeinflussen waren. Dies ist jedoch auf die klinische Anwendung nicht übertragbar. Eine Prävention des Nachstars scheint nach unseren Untersuchungen mit dem von uns verwendeten cRGD $\beta$ FV nicht erfolgversprechend. Eine Ablösung adhärenter Zellen von Kapseln gelang nicht, da für die Stabilität der Verbindungen auch Zell-Zell-Interaktionen durch Cadherine eine große Rolle [84] spielen. Diese sind ausschließlich Kalziumabhängig. Das zugefügte synthetische RGD-Peptid bindet kompetitiv zu den Adhäsionsproteinen der extrazellulären Matrix, so daß auch ein Überwiegen der Liganden auf deren Seite gegenüber dem löslichen RGD-Peptid denkbar ist. Auch ist davon auszugehen, daß nach Ausbildung eines adhärenten Zellrasens eine große Anzahl verschiedenster Adhäsionsmechanismen wirkt. Bereits bestehende Verbindungen waren somit nicht mehr zu lösen. Lediglich die Nachstarmasse des humanen Spenders ließ sich unter Druck und nach Einwirkung von cRGD $\beta$ FV sehr gut lösen. Hier ist bereits mit ei-

ner reduzierten Adhäsion dieser transformierten Zellen zu rechnen. Aufgrund der kleinen Anzahl an zur Verfügung stehenden Spendern sind sicherlich weitere Untersuchungen erforderlich. Eine Nutzung des RGD-Peptids cRGD $\alpha$ FV zur erleichterten Nachstar-Absaugung wäre denkbar.

## 7. Literaturverzeichnis

- 1 Naumann GOH (Hrsg.): Pathologie des Auges. Band II. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg 1997; 845-894
- 2 Marshall GE, Konstas AGP, Bechrakis NE, et al.: An immunoelectron microscope study of the aged human lens capsule. *Exp Eye Res* 1992; 54:393-401
- 3 Cammarata PR, Cantu-Crouch D, Oakford L, et al.: Macromolecular organization of bovine lens capsule. *Tissue Cell* 1986; 18:83-97
- 4 Schmitt-Gräf A, Pau H, Spahr R, et al.: Appearance of alpha-smooth muscle actin in human eye lens cells of anterior capsular cataract and in cultured bovine lensforming cells. *Differentiation* 1990; 43:115-122
- 5 Dick B, Schwenn O, Pfeiffer N: Einteilung der viskoelastischen Substanzen für die Ophthalmochirurgie. *Ophthalmologe* 1999; 96:193-211
- 6 Hollick EJ, Spalton DJ, Ursell PG: The effect of polymethacrylate, silicone, and polyacrylic intraocular lenses on posterior capsule opacification 3 years after cataract surgery. *Ophthalmology* 1999; 106:49-54
- 7 Apple DJ, Solomon KD, Tetz MR, et al.: Posterior capsule opacification. *Surv Ophthalmol* 1992; 37(2):73-116
- 8 Tetz MR, Nimsger C: Posterior capsule opacification. Part 2: Clinical findings. *J Cat Refract Surg* 1999; 25(12):1662-1674
- 9 Fagerholm P: The response of the lens to trauma. *Ophthalmic Soc. UK* 1982, 102(3):369-374
- 10 Shigemitsu T, Majima Y, Shimizu Y: Immunohistochemical studies on factors involved in after cataract. *J Jpn Ophthalmol Soc* 1998; 102:531-539
- 11 Ibaraki N, Lin L-R, Reddy VN: Effects of growth factors on proliferation and differentiation in human lens epithelial cells in early subculture. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1995; 36:2304-2312
- 12 Nishi O, Nishi K, Fujiwara T, et al.: Effects of the cytokines on the proliferation of and collagen synthesis by human cataract lens epithelial cells. *Br J Ophthalmol* 1996; 80:63-68
- 13 Kurosaka D, Nagamoto T: Inhibitory effect of TGF- $\beta$ 2 in human aqueous humor on bovine lens epithelial cell proliferation. *Invest. Ophthalmol Vis Sci* 1994; 35:3408-3412

- 
- 14 Malecaze F, Chollet P, Cavois E, et al.: Role of interleukin 6 in the inflammatory response after cataract surgery; an experimental and clinical study. *Arch Ophthalmol* 1991; 109:1681-1683
  - 15 Kurosaka D, Kato K, Nagamoto T, Negishi K: Growth factors influence contractility and  $\alpha$ -smooth muscle actin expression in bovine lens epithelial cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1995; 36:1701-1708
  - 16 McGahan MC, Harned J, Goralska M, et al.: Transferrin secretion by lens epithelial cells in culture. *Exp Eye Res* 1995; 60:667-673
  - 17 Davidson MG, Harned J, Grimes AM, et al.: Transferrin in after-cataract and as a survival factor for lens epithelium. *Exp Eye Res* 1998; 66:207-215
  - 18 Nishi O, Nishi K, Akaishi T, et al.: Detection of cell adhesion molecules in lens epithelial cells of human cataracts. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1997; 38:579-585
  - 19 Ruoslahti E: Stretching is good for a cell. *Science* 1997; 276:1345-1346
  - 20 McGill G, Shimamura A, Bates RC, et al.: Loss of matrix triggers rapid transformation-selective apoptosis in fibroblasts. *J Cell Biol* 1997; 138:901-911
  - 21 Ranta P, Kivelä T: Retinal detachment in pseudophakic eyes with and without Nd:YAG laser posterior capsulotomy. *Ophthalmology* 1998; 105(11):2127-2133
  - 22 Powell SK, Olson RJ: Incidence of retinal detachment after cataract surgery and neodymium:YAG laser capsulotomy. *J Cataract Refract Surg* 1995; 21:132-135
  - 23 Nishi O: Posterior capsule opacification. Part I: Experimental investigations. *J Cataract Refract Surg* 1999; 25:106-117
  - 24 Hara T, Hara T, Sakanishi K, et al.: Efficacy of equator rings in an experimental rabbit study. *Arch Ophthalmol* 1995; 113:1060-1065
  - 25 Nishi O, Nishi K, Mano C, et al.: The inhibition of lens epithelial cell migration by a discontinuous capsular bend created by a band-shaped circular loop or a capsule-bending ring. *Ophthalmic Surg Lasers* 1998; 29:119-125
  - 26 Ravalico G, Tognetto D, Palomba MA, et al.: Capsulorhexis size and posterior capsule opacification. *J Cataract Refract Surg* 1996; 13:1903-1907
  - 27 Nagata T, Watanabe I.: Optic sharp edge or convexity: comparison of effects on posterior capsule opacification. *Jpn J Ophthalmol* 1996; 40:397-403

- 
- 28 Nishi O, Nishi K: Prevention of posterior capsule opacification by the creation of a discontinuous sharp bend in the capsule. *J Cataract Refract Surg* 1999; 25:521-526
  - 29 Cunanan CM, Tarbaux NM, Knight PM: Surface properties of intraocular lens materials and their influence on in vitro cell adhesion. *J Cataract Refract Surg* 1991; 17:767-773
  - 30 Yamada K, Nagamoto T, Yozawa H, et al.: Effect of intraocular lens design on posterior capsule opacification after continuous curvilinear capsulorhexis. *J Cataract Refract Surg* 1995; 21:697-700
  - 31 Hollick EJ, Spalton DJ, Ursell PG, et al.: Biocompatibility of poly(methylmethacrylate), silicone, and AcrySof intraocular lenses: Randomized comparison of the cellular reaction on the anterior lens surface. *J Cataract Refract Surg* 1998; 24:361-366
  - 32 Power WJ, Neylan D, Collum LMT: Daunomycin as an inhibitor of human lens epithelial cell proliferation in culture. *J Cataract Refract Surg* 1994; 20:287-290
  - 33 Hartmann C, Wiedemann P, Gothe K, et al.: Nachstarprävention durch endokapsuläre Daunomycinapplikation. In: Freyler H, Skorpik C, Grasl M, eds, 3. Kongreß der Deutschen Gesellschaft für Intraokularlinsen Implantation; 2. bis 4. März 1989, Wien. Wien, New York, Springer-Verlag, 1990; 414-422
  - 34 Tetz MR, Ries MW, Lucas C, et al.: Inhibition of posterior capsule opacification by an intraocular-lens-bound sustained drug delivery system: an experimental animal study and literature review. *J Cataract Refract Surg* 1996; 22:1070-1078
  - 35 Pearson PA, Solomon KD, Woodford S, et al.: Inhibition of posterior capsule opacification using sustained delivery 5-fluorouracil. ARVO abstract 638. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1991; 32:797
  - 36 Ismail MM, Alió JL, Moreno JMR: Prevention of secondary cataract by antimitotic drugs: experimental study. *Ophthalmic Res* 1996; 28:64-69
  - 37 Ruiz JM, Medrano M, Alió JL: Inhibition of posterior capsule opacification by 5-fluorouracil in rabbits. *Ophthalmic Res* 1990; 22:201-208
  - 38 McDonnell PJ, Krause W, Glaser BM: In vitro inhibition of lens epithelial cell prolifera-

- 
- ration and migration. *Ophthalmic Surg* 1988; 19:25-30
- 39 Hansen TJ, Tyndall R, Soll DB: Methotrexate-Anticollagen conjugate inhibits in vitro lens cell outgrowth. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1987; 28:1206-1209
- 40 Haus CM, Galand AL: Mitomycin against posterior capsular opacification: an experimental study in rabbits. *Br J Ophthalmol* 1996; 80:1087-1091
- 41 Legler UFC, Apple DJ, Assia EI, et al.: Inhibition of posterior capsule opacification: the effect of colchicine in a sustained drug delivery system. *J Cataract Refract Surg* 1993; 19:462-470
- 42 Shin DH; Kim YY, Ren J, et al.: Decrease of capsular opacification with adjunctive mitomycin C in combined glaucoma and cataract surgery. *Ophthalmology* 1998; 105:1222-1226
- 43 Davidson MG, Harned J, Grimes AM et al.: Transferrin in after-cataract and as a survival factor for lens epithelium. *Exp Eye Res* 1998; 66:207-215
- 44 Goins KM, Ortiz JR, Fulcher SFA, et al.: Inhibition of proliferating lens epithelium with antitransferrin receptor immunotoxin. *J Cataract Refract Surg* 1994; 20:513-516
- 45 Clark DS, Emery JM, Munsell MF: Inhibition of posterior capsule opacification with an immunotoxin specific for lens epithelial cells: 24 month clinical results. *J Cataract Refract Surg* 1998; 24:1614-1620
- 46 Behar-Cohen F F, David T, D'Hermies F, et al.: In vivo inhibition of lens regrowth by fibroblast growth factor 2-Saporin. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1995; 36:2434-2448
- 47 Bretton HR, Swearingen A, Kash RL, et al.: Use of a polylysine-saporin conjugate to prevent posterior capsule opacification. *J Cataract Refract Surg* 1999; 25:921-929
- 48 Hunold W, Wirtz M, Kreiner C, et al.: Linsen-Epithel-Nekrose-Faktor (LENF) zur Nachstarverhütung. *Fortschr Ophthalmol* 1991; 88(4):386-389
- 49 Meacock WR, Spalton DJ, Hollick EJ, et al.: Double-masked prospective ocular safety study of a lens epithelial cell antibody to prevent posterior capsule opacification. *J Cat Refract Surg* 2000; 26:716-721
- 50 Nishi O, Nishi K, Fujiwara T, et al.: Effects of diclofenac sodium and indomethacin on proliferation and collagen synthesis of lens epithelial cells in vitro. *J Cataract Refract Surg* 1995; 21:461-465



- 
- 51 Nishi O, Nishi K, Yamada Y, et al.: Effect of indomethacin-coated posterior chamber intraocular lenses on postoperative inflammation and posterior capsule opacification. *J Cataract Refract Surg* 1995; 21:574-578
  - 52 Cortina P, Gómez-Lechón MJ, Navea A, et al.: Diclofenac sodium and cyclosporin A inhibit human lens epithelial cell proliferation in culture. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 1997; 235:180-185
  - 53 Nishi O, Nishi K, et al.: Effects of diclofenac sodium and indomethacin on proliferation and collagen synthesis of lens epithelial cells in vitro. *J Cataract Refract Surg* 1995; 21(4):461-465
  - 54 Duncan G, Wormstone IM, Liu CSC, et al.: Thapsigargin-coated intraocular lenses inhibit human lens cell growth. *Nat Med* 1997; 3:1026-1028
  - 55 Nishi O, Nishi K, Mano C, et al.: Inhibition of migrating lens epithelial cells by blocking the adhesion molecule integrin: a preliminary report. *J Cataract Refract Surg* 1997; 23:860-865
  - 56 Palmade F, Sechoy-Chambon O, Regnoul de Vains J, et al.: Inhibition of cell adhesion to lens capsule by LCM 1910, an RGD-derived peptide. *J Ocular Pharmacol* 1994; 10(4):623-632
  - 57 Oharazawa H, Ibaraki N, Matsui H, et al.: Inhibitory effects of RGD-peptide on cell attachment in a human lens epithelial cell line. *ARVO Abstracts* 1998, No 981
  - 58 Hasegawa T, Kiritoshi A, Nakamura T, et al.: Cyclo (GRGDSPA) inhibits cell adhesion and migration of rabbit lens epithelial cells after cataract surgery in vivo. *ARVO Abstract* 1998, No 1414
  - 59 Grinnell F, Feld MK: Initial adhesion of human fibroblasts in serum-free medium: possible role of secreted fibronectin. *Cell* 1979; 17:117-129
  - 60 Arita T, Murata Y, Lin L-R, et al.: Synthesis of lens capsule in long-term culture of human lens epithelial cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1993; 34:355-362
  - 61 McGill G, Shimamura A, Bates RC, et al.: Loss of matrix triggers rapid transformation-selective apoptosis in fibroblasts. *J Cell Biol* 1997; 138:901-911
  - 62 Pierschbacher M, Ruoslahti E: Cell attachment activity of Fibronectin can be duplicated by small synthetic fragments of the molecule. *Nature* 1984; 309:30-33

- 
- 63 Hynes R: Integrins: Versality, Modulation, and Signaling in Cell Adhesion. *Cell* 1992; 69:11-25
- 64 Yue BY: The extracellular matrix and its modulation in the trabecular meshwork. *Surv Ophthalmol* 40; 5:379-390
- 65 Mohri H: Interaction of fibronectin with integrin receptors: Evidence by use of synthetic peptides. *Peptides* 1997; 18:899-907
- 66 Lauffenburger DA, Horwitz AF: Cell migration: a physically integrated molecular process. *Cell* 1996; 84:359-369
- 67 Yamada KM: Adhesive Recognition Sequences. *J Biol Chem* 1991; 266:12809-12812
- 68 Olivero DK, Furcht LT: Type IV collagen, laminin, and fibronectin promote the adhesion and migration of rabbit lens epithelial cells in vitro. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1993; 34:2825-2834
- 69 Pierschbacher MD, Ruoslahti E, Sundelin J, et al.: The cell attachment domain of fibronectin. *J Biol Chem* 1982; 257:9593-9595
- 70 Pierschbacher MD, Ruoslahti E: Cell attachment activity of fibronectin can be duplicated by small synthetic fragments of the molecule. *Nature* 1984; 309:30-33
- 71 Pierschbacher MD, Ruoslahti E: Variants of the cell recognition site of fibronectin that retain attachment-promoting activity. *Proc Natl Acad Sci USA* 1984; 81:5985-5988
- 72 Gurrath M, Müller G, Kessler H, et al.: Conformational/activity studies of rationally designed potent anti-adhesive RGD-peptides. *Eur J Biochem* 1992; 210:911-921
- 73 Pierschbacher MD, Ruoslahti E: Influence of stereochemistry of the sequence Arg-Gly-Asp-Xaa on binding specificity in cell adhesion. *J Biol Chem* 1987; 262:17294-17298
- 74 Buckley CD, Pilling D, Henriquez NV, et al.: RGD peptides induce apoptosis by direct caspase-3 activation. *Nature* 1999; 397:534-539
- 75 Cook JJ, Huang TF, Rucinski B, et al.: Inhibition of platelet hemostatic plug formation by trigramin, a novel RGD-peptide. *Am J Physiol* 1989; 256: H1038-1043
- 76 Haymann EG, Pierschbacher MD, Ruoslahti E: Detachment of cells from culture

- 
- substrate by soluble fibronectin peptides. *J Cell Biol* 1985; 100:1948-1954
- 77 Walluschk KP, Steinhoff G, Kelm S, et al.: Improved endothelial cell attachment on ePTFE vascular grafts pretreated with synthetic RGD-containing peptides. *Eur J Vasc Endovasc Surg* 1996; 12(3):321-330
- 78 Mertz PM, Davis SC, Franzen L, et al.: Effects of an arginine-glycine-aspartic acid peptide-containing artificial matrix on epithelial migration in vitro and experimental second-degree burn wound healing in vivo. *J Burn Care Rehabil* 1996; 17(3):199-206
- 79 Timonen T, Gahmberg CG, Patarroyo M: Participation of CD11a-c/CD18, CD2 and RGD-binding receptors in endogenous and interleukin-2-stimulated NK activity of CD3-negative large granular lymphocytes. *Int J Cancer* 1990; 46(6):1035-1040
- 80 Meyer M, Thieme A, Jablonka B, et al.: A new variant of Glanzmann's thrombasthenia with defective activation –dependent fibrinogen binding and altered expression of epitopes for several monoclonal antibodies against GP IIb-IIIa. *Platelets* 1996; 7/4:215-224
- 81 Noiri E, Gailit J, Sheth D, et al.: Cyclic RGD peptides ameliorate ischemic acute renal failure in rats. *Kidney Int* 1994; 46:1050-1058
- 82 Heymann EG, Pierschbacher MD, Suzuki S, et al.: Vitronectin – a major cell attachment-promoting protein in fetal bovine serum. *Exp Eye Res* 1985; 160:245-258
- 83 Oharazawa H, Ibaraki N, Lin L-R, et al.: The effects of extracellular matrix on cell attachment, proliferation and migration in a human lens epithelial cell line. *Exp Eye Res* 1999; 69:603-610
- 84 Gumbiner BM: Cell adhesion: The molecular basis of tissue architecture and morphogenesis. *Cell* 1996; 84:345-357
- 85 Aumailley M, Gurrath M, Müller G, et al.: Arg-Gly-Asp constrained within cyclic pentapeptides. Strong and selective inhibitors of cell adhesion to vitronectin and laminin fragment P1. *FEBS* 1991; 29/1:50-54

## **9. Veröffentlichungen**

1. Bertelmann E, Kojetinsky C: Posterior capsule opacification and anterior capsule opacification. Curr Opin Ophthalmol 2001; 12:35-40
2. Kojetinsky C, Baatz H, Pleyer U, et al.: In vitro Untersuchungen an bovinen und humanen Linsenepithelzellkulturen zur Nachstarhemmung mittels eines zyklischen RGD-Peptids. Ophthalmologe 2001; 98:731-735

### **Kongreßbeiträge:**

- Jahrestagung der DGII 1999: Fritzsche C, Rieck P, Baatz H, et al.: Adhäsionsinhibition von Linsenepithelzellen durch ein zyklisches RGD-Peptid. (Vortrag)
- Jahrestagung der DOG 1999: Fritzsche C, Rieck P, Baatz H: In vitro Untersuchungen an bovinen und humanen Linsenepithelzellkulturen zur Adhäsionsinhibition mittels eines zyklischen RGD-Peptids. (Vortrag)
- Jahrestagung der ARVO 1999: Fritzsche C, Rieck P, Baatz H, et al.: Inhibition of lens epithelial cell adhesion in vitro by short-term incubation of a cyclo-RGD-peptide. (Poster)
- Jahrestagung der ARVO 2000: Kojetinsky C, Latz C, Hartmann C, et al.: Detachment of human lens epithelial cells from human anterior capsules by a cyclo-RGD-peptide. (Poster)

## **10. Danksagung**

Zuallererst gilt mein Dank Herrn PD Dr. Dr. P. Rieck, Universitäts-Augenklinik der Charité, für die Anregung des Promotionsthemas. Er hat durch seinen jederzeit gewährten, wertvollen Rat, seine konstruktive Kritik und intensive Betreuung ganz entscheidend zum Gelingen der Arbeit beigetragen.

Besonderer Dank gilt Herrn Dr. H. Baatz, Universitätsaugenklinik Frankfurt/Main, für den wissenschaftlichen Gedankenaustausch. Desweiteren danke ich Frau Chr. Jäckel für die Hilfestellungen bei der Arbeit in der Hornhautbank der Charité sowie Herrn Prof. Dr. M. Tetz für das freundliche Überlassen der Operationspräparate.

Meinem Mann, Herrn Jura Kojetinsky, danke ich besonders für das intensive Korrekturlesen, viele wertvolle Ratschläge für die Arbeit am Computer und vor allem für die große Geduld und Ermunterung.

Herrn Prof. Dr. Dr. (F) Chr. Hartmann, Direktor der Universitäts-Augenklinik der Charité, danke ich für die Nutzung der Laborräume und des Laborinventars der Klinik, sowie für seine Geduld und Hilfestellung, die den Erfolg der Arbeit ermöglicht haben.

## **11. Erklärung an Eides Statt**

Ich erkläre ehrenwörtlich, daß ich die dem Fachbereich Humanmedizin der Humboldt-Universität zu Berlin zur Promotionsprüfung eingereichte Arbeit mit dem Titel:

### **Untersuchungen zur Nachstarprävention in vitro mittels des zyklischen RGD-Peptids cRGD<sub>9</sub>FV**

In der Augenklinik der Charité  
Campus Virchow  
(Direktor: Prof. Dr. Dr. (F) Chr. Hartmann)  
Medizinische Fakultät der  
Humboldt-Universität zu Berlin,  
unter der Leitung von  
PD Dr. Dr. P. Rieck,

ohne sonstige Hilfe selbst durchgeführt habe und bei der Abfassung der Arbeit keine anderen als die in der Dissertation angeführten Hilfsmittel verwendet habe.

Ich habe bisher an keiner in- und ausländischen Medizinischen Fakultät bzw. Fachbereich ein Gesuch um Zulassung zur Promotion eingereicht, noch die vorliegende Arbeit als Dissertation vorgelegt.

Auszüge aus der Arbeit wurden in den unter Kapitel 9 genannten Publikationsorganen veröffentlicht.

Ort, Datum

Unterschrift